

REC'D 02 MAY 2003

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日  
Date of Application:

2002年 3月 7日

出願番号  
Application Number:

特願2002-109794

[ST.10/C]:

[JP2002-109794]

出願人  
Applicant(s):

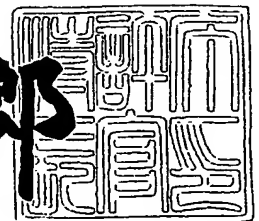
富士写真フイルム株式会社  
シーリング アクチエンゲゼルシャフト

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 3月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3014354

【書類名】	特許願
【整理番号】	A11561M
【提出日】	平成14年 3月 7日
【特記事項】	特許法第36条の2第1項の規定による特許出願
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	C07D209/02
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真フイルム株式会社内
【氏名】	川上 雅之
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真フイルム株式会社内
【氏名】	北口 博司
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真フイルム株式会社内
【氏名】	相川 和広
【発明者】	
【住所又は居所】	ドイツ連邦共和国, デー-14612 ファルケンゼー, ボルニマ シュトラッセ 17アー
【氏名】	カイ リヒャ
【発明者】	
【住所又は居所】	ドイツ連邦共和国, デー-10155 ベルリン, アッカシュトラッセ 40
【氏名】	クリスティン ペルリッツ
【発明者】	
【住所又は居所】	兵庫県川西市清和台西2丁目1-72
【氏名】	江口 博明

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県西宮市名次町 5 - 1 1

【氏名】 津田 奈津子

【特許出願人】

【識別番号】 000005201

【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 599131011

【氏名又は名称】 シェリング アクチェンゲゼルシャフト

【代理人】

【識別番号】 100096219

【弁理士】

【氏名又は名称】 今村 正純

【代理人】

【識別番号】 100092635

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【代理人】

【識別番号】 100095843

【弁理士】

【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 038357

【納付金額】 35,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 外国語明細書 1

【物件名】 外国語図面 1

【物件名】 外国語要約書 1

【包括委任状番号】 9800464

\*\*\*

【特許出願人】

【法人の法的性質】 ドイツ国法に基づく法人



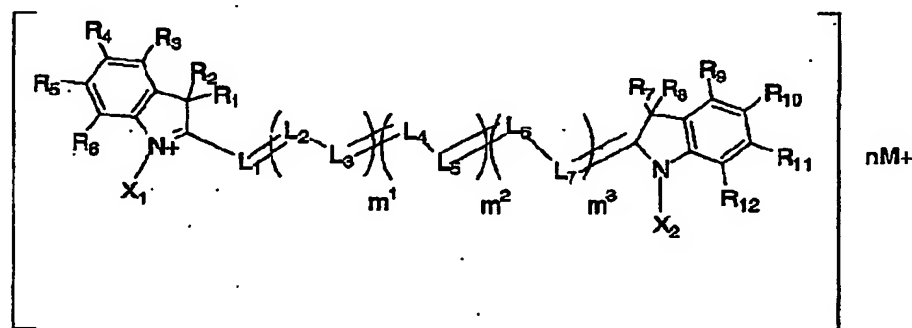
【書類名】 外国語明細書

## 1. TITLE OF INVENTION

Near infrared fluorescent contrast agent and method for fluorescence imaging

## 2. CLAIMS

1. A near infrared fluorescent contrast agent comprising a compound represented by the following formula [I] or a pharmaceutically acceptable salt thereof:

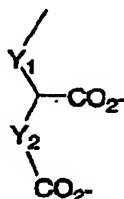


wherein  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^7$ , and  $R^8$  independently represent a substituted or unsubstituted  $C_1$ - $C_{10}$  alkyl group or a substituted or unsubstituted aryl group, and  $R^1$  and  $R^2$  and/or  $R^7$  and  $R^8$  may bind to each other to form a ring;  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ , and  $R^{12}$  independently represent a hydrogen atom, a substituted or unsubstituted  $C_1$ - $C_6$  alkyl group, a substituted or unsubstituted aryl group, a substituted or unsubstituted heteroaryl group, a halogen atom, cyano group, carboxyl group, or sulfo group, and  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ , and  $R^{12}$  may bind to each other to form a ring;  $X^1$  and  $X^2$  independently represent a substituted or unsubstituted  $C_1$ - $C_{16}$  alkyl group or a substituted or unsubstituted aryl group and  $X^1$  and  $X^2$  in total have 0 to 4 carboxyl groups, provided that when the number of the carboxyl group is 0 or 1, each of  $X^1$  and  $X^2$  is a  $C_1$ - $C_6$  carboxyalkyl group or a sulfoalkyl group and at least one of  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ , and  $R^{12}$  represents a substituted or unsubstituted aryl group or a substituted or unsubstituted heteroaryl group;  $m^1$  represents 0 or 1;  $m^2$  represents 0 or 1;  $m^3$  represents 0 or 1;  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $L^4$ ,  $L^5$ ,  $L^6$ , and  $L^7$  independently represent a substituted or unsubstituted methine group, provided that when two or more of the methine groups have substituents, the substituent may bind to each other to form a ring, provided that when each of  $X^1$  and  $X^2$  has one carboxyl group, each of  $X^1$  and  $X^2$  is

carboxyl group-substituted hydrocarbon group and at least one of the methine groups represented by  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $L^4$ ,  $L^5$ ,  $L^6$ , and  $L^7$  is a substituted methine group and  $R^4$  and  $R^{10}$  represent a sulfo group;  $M$  represents a hydrogen atom, a metal, or a quaternary ammonium salt; and  $n$  represents an integer of 1 to 7 necessary for neutralizing charge.

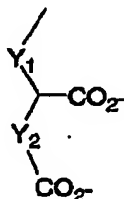
2. The near infrared fluorescent contrast agent according to claim 1, wherein each of  $m^1$ ,  $m^2$ , and  $m^3$  is 1.

3. The near infrared fluorescent contrast agent according to claim 1 or 2, wherein  $X^1$  is a group represented by the following formula (i):



wherein  $Y^1$  and  $Y^2$  independently represent a substituted or unsubstituted divalent linking group.

4. The near infrared fluorescent contrast agent according to claim 1 or 2, wherein  $X^1$  and  $X^2$  independently represent a group represented by the following formula (i):



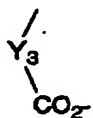
wherein  $Y^1$  and  $Y^2$  independently represent a substituted or unsubstituted a divalent bond.

5. The near infrared fluorescent contrast agent according to any one of claims 1 to 4, wherein at least one of  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ , and  $R^{12}$  is a substituted or unsubstituted aryl group or a substituted or unsubstituted heteroaryl group.

6. The near infrared fluorescent contrast agent according to claim 1 or 2,

wherein at least one of  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^{10}$ , and  $R^{11}$  is a substituted or unsubstituted aryl group or a substituted or unsubstituted heteroaryl group; and each of  $X^1$  and  $X^2$  is independently a  $C_1$ - $C_5$  carboxylalkyl group or a sulfoalkyl group.

7. The near infrared fluorescent contrast agent according to claim 1 or 2, wherein  $X^1$  and  $X^2$  independently represent a group represented by the following formula:



wherein  $Y^3$  represents a  $C_1$ - $C_{10}$  hydrocarbon group and at least one of the methine groups represented by  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $L^4$ ,  $L^5$ ,  $L^6$ , and  $L^7$  is a substituted methine group and each of  $R^4$  and  $R^{10}$  is a sulfo group.

8. The near infrared fluorescent contrast agent according to any one of claims 3 or 4 wherein  $Y_1$  represents  $-(CH_2)_pCONH-$  wherein  $p$  represents an integer of 1 to 4 and  $Y_2$  represents  $-(CH_2)-$  or  $(CH_2)_2-$ .

9. The near infrared fluorescent contrast agent according to any of claims 1 to 8, which is used for tumor imaging.

10. The near infrared fluorescent contrast agent according to any of claims 1 to 8, which is used for angiography.

11. A method of fluorescence imaging which comprises the steps of introducing the near infrared fluorescent contrast agent according to any of claims 1 to 8 into a living body, exposing said body to an excitation light, and detecting near infrared fluorescence from the contrast agent.

### 3. DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION

#### Technical Field

The present invention relates to a near infrared fluorescent contrast agent, and a method of fluorescence imaging using said near infrared fluorescent contrast agent.

## Background Art

In treating disease, it is important to detect morphological and functional changes caused by the disease in the living body at an early stage of the disease. Especially for treatment of a cancer, to know the site and size of the tumor beforehand is an extremely important means to determine strategies and protocols for future treatment. Methods so far applied include biopsy by puncture and the like, as well as imaging diagnosis such as X-ray imaging, MRI, ultrasound imaging and the like. Biopsy is an effective means for definitive diagnosis, however, it places great burden on a patient to be diagnosed, and also is not suitable for tracing changes with time in lesions. X-ray imaging and MRI inevitably cause exposure of a patient to be diagnosed with irradiation or electromagnetic wave. In addition, conventional imaging diagnoses as mentioned above require complicated operation and a prolonged time for measurement and diagnosis. A large size of an apparatus also makes it difficult to apply these methods during surgical operation.

One of reported image diagnoses includes fluorescence imaging (Lipsyn R. L. et al., J. Natl. Cancer Inst., 26, 1-11 (1961)). This method employs a substance as a contrast agent that emits fluorescence upon exposure to an excitation light having a specific wavelength. The method comprises the step of exposing a body with an excitation light from outside the body and then detecting fluorescence emitted from the fluorescent contrast agent in vivo.

An example of the fluorescent contrast agent include, for example, a porphyrin compound that accumulates in tumor and is used for photodynamic therapy (PDT), e.g., haematoporphyrin. Other examples include photoporphyrin and benzoporphyrin (see, Lipsyn R. L. et al., supra, Meng T. S. et al., SPIE, 1641, 90-98 (1992), WO84/04665 and the like). However, these compounds have phototoxicity since they are originally used for PDT (PDT requires such property), and accordingly, these compounds are not desirable as diagnostic agents.

Retinal circulatory microangiography using a known fluorescent dye, such as fluorescein, fluorescamine, and riboflavin, has been known (U.S. Patent No. 4945239). However, these fluorescent dyes emit fluorescence in a region of a visible light of 400-600 nm which only achieves low transmission through living tissue, and consequently, detection of a lesion in a deeper part of a body is almost impossible.

Cyanine compounds including indocyanine green (hereinafter abbreviated as "ICG"), which are used to determine liver function and cardiac output, have been also reported to be useful as fluorescent contrast agents (Haglund M. M. et al., Neurosurgery, 35, 930 (1994), Li, X. et al., SPIE, 2389, 789-797(1995)). Cyanine compounds have absorbance in a near infrared light region (700 to 1300 nm).

Near infrared light has a high transmission property through living tissues and can pass through the skull of about 10 cm, and from these reasons, said light has been focused recently in the field of clinical medicine. For example, the optical CT technique (a CT technique using optical transmission of a medium) has become focused as a new technology in the clinical field, because near infrared light can pass through a living body and, oxygen concentration and circulation in vivo can be detected by using a light within this region.

The cyanine compound emits fluorescence in the near infrared region, a light of which region has excellent permeability in living tissues as explained above, and accordingly a use as a fluorescent contrast agent has been proposed. Various cyanine compounds have been developed in recent years, and approaches for use as fluorescent contrast agents have been made (WO96/17628, WP97/13490 and the like). However, an agent having a satisfactory distinguishing ability of a lesion from normal tissues, i.e., an agent having a satisfactory selectivity to a target site to be imaged, has not yet been available.

#### Objects to be Solved by the Invention

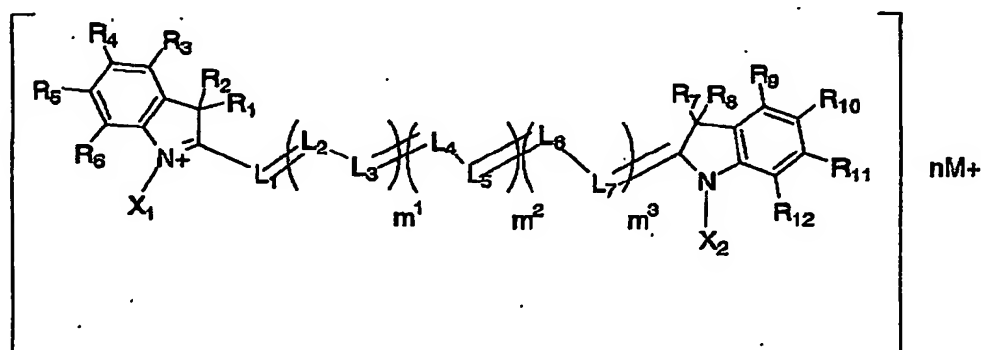
An object of the present invention is to provide a fluorescent contrast agent which emits fluorescence in the near infrared region that is excellent in permeability in a living tissue, and enables specific imaging of tumor and/or blood vessel. Another object of the present invention is to provide a method of fluorescence imaging using said near infrared fluorescent contrast agent.

#### Means to Achieve the Objects

The inventors of the present invention conducted various studies to achieve the foregoing objects. As a result, by introducing carboxylic acid or an aryl group to cyanine dyes, they succeeded in providing a fluorescent contrast agent having high

tumor selectivity. They also succeeded in establishing a method for fluorescence imaging by using said contrast agent. The present invention was achieved on the basis of the above findings.

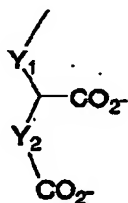
The present invention thus provides a near infrared fluorescent contrast agent comprising a compound represented by the following formula [I] or a pharmaceutically acceptable salt thereof:



wherein R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>7</sup>, and R<sup>8</sup> independently represent a substituted or unsubstituted C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl group or a substituted or unsubstituted aryl group, and R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> and/or R<sup>7</sup> and R<sup>8</sup> may bind to each other to form a ring; R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>11</sup>, and R<sup>12</sup> independently represent a hydrogen atom, a substituted or unsubstituted C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl group, a substituted or unsubstituted aryl group, a substituted or unsubstituted heteroaryl group, a halogen atom, cyano group, carboxyl group, or sulfo group, and R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>11</sup>, and R<sup>12</sup> may bind to each other to form a ring; X<sup>1</sup> and X<sup>2</sup> independently represent a substituted or unsubstituted C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub> alkyl group or a substituted or unsubstituted aryl group and X<sup>1</sup> and X<sup>2</sup> in total have 0 to 4 carboxyl groups, provided that when the number of the carboxyl group is 0 or 1, each of X<sup>1</sup> and X<sup>2</sup> is a C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> carboxyalkyl group or a sulfoalkyl group and at least one of R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>11</sup>, and R<sup>12</sup> represents a substituted or unsubstituted aryl group or a substituted or unsubstituted heteroaryl group; m<sup>1</sup> represents 0 or 1; m<sup>2</sup> represents 0 or 1; m<sup>3</sup> represents 0 or 1; L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup>, L<sup>4</sup>, L<sup>5</sup>, L<sup>6</sup>, and L<sup>7</sup> independently represent a substituted or unsubstituted methine group, provided that when two or more of the methine groups have substituents, the substituent may bind to each other to form a ring, provided that when each of X<sup>1</sup> and X<sup>2</sup> has one carboxyl group, each of X<sup>1</sup> and X<sup>2</sup> is

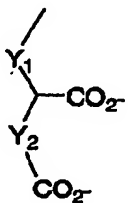
carboxyl group-substituted hydrocarbon group and at least one of the methine groups represented by  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $L^4$ ,  $L^5$ ,  $L^6$ , and  $L^7$  is a substituted methine group and  $R^4$  and  $R^{10}$  represent a sulfo group;  $M$  represents a hydrogen atom, a metal, or a quaternary ammonium salt; and  $n$  represents an integer of 1 to 7 necessary for neutralizing charge.

According to a preferred embodiment of the above invention, each of  $m^1$ ,  $m^2$ , and  $m^3$  is simultaneously 1, and  $X^1$  is a group represented by the following formula (i):



wherein  $Y^1$  and  $Y^2$  independently represent a substituted or unsubstituted divalent linking group.

According to a more preferred embodiment,  $X^1$  and  $X^2$  independently represent a group represented by the following formula (i):

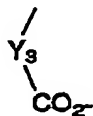


wherein  $Y^1$  and  $Y^2$  independently represent a substituted or unsubstituted a divalent bond.

According to further preferred embodiment, at least one of  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ , and  $R^{12}$  is a substituted or unsubstituted aryl group or a substituted or unsubstituted heteroaryl group, and according to still further preferred embodiment, at least one of  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^{10}$ , and  $R^{11}$  is a substituted or unsubstituted aryl group or a substituted or unsubstituted heteroaryl group; and each of  $X^1$  and  $X^2$  is independently a  $C_1$ - $C_5$  carboxylalkyl group or a sulfoalkyl group.

According to another preferred embodiment,  $X^1$  and  $X^2$  independently

represent a group represented by the following formula:



wherein  $Y^3$  represents a  $C_1$ - $C_{10}$  hydrocarbon group and at least one of the methine groups represented by  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $L^4$ ,  $L^5$ ,  $L^6$ , and  $L^7$  is a substituted methine group and each of  $R^4$  and  $R^{10}$  is a sulfo group.

Preferably, the number of sulfo group in a molecule is two or less.

According to further preferred embodiment,  $Y_1$  represents  $-(CH_2)_pCONH-$  wherein  $p$  represents an integer of 1 to 4 and  $Y_2$  represents  $-(CH_2)-$  or  $(CH_2)_2-$ .

The aforementioned near infrared fluorescent contrast agent may preferably be used for tumor imaging or angiography.

From another aspect, provided is a method of fluorescence imaging which comprises the steps of introducing the aforementioned near infrared fluorescent contrast agent into a living body, exposing said body to an excitation light, and detecting near infrared fluorescence from the contrast agent.

#### Mode for Carrying Out the Invention

The  $C_1$ - $C_{10}$  alkyl group represented by  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^7$ , and  $R^8$  may be linear, branched, cyclic, or a combination thereof (an alkyl group and an alkyl moiety of a functional group containing the alkyl moiety have the same meaning in the specification unless otherwise specifically mentioned). As the unsubstituted alkyl group, for example, methyl group, ethyl group, propyl group, butyl group, and hexyl group can be used. The number, kind, or position of substituents on the substituted alkyl group are not particularly limited. As the substituted alkyl, for example, sulfoalkyl group, carboxylalkyl group, hydroxyalkyl group, alkoxyalkyl group, aminoalkyl group, halogenated alkyl group, cyanoalkyl group, aryl-substituted alkyl group, heteroaryl-substituted alkyl group and the like can be used.

The aryl group represented by  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^7$ , and  $R^8$  may be either a monocyclic ring or a condensed ring, for example, a  $C_6$ - $C_{14}$  aryl group, preferably  $C_6$ - $C_{10}$  aryl group



can be used (an aryl group and an aryl moiety of a functional group containing the aryl moiety have the same meaning unless otherwise specifically mentioned). As the aryl group, preferably phenyl group or naphthyl group, more preferably phenyl group may be used. As the substituted aryl group, sulfophenyl group, hydroxyphenyl group, aminophenyl group can be used.

Further,  $R^1$  and  $R^2$ ,  $R^7$  and  $R^8$  may bind to each other to form a ring. Examples of the ring formed include, for example, cyclopentyl ring, cyclohexyl ring and the like.  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^7$ , and  $R^8$  are preferably methyl group or ethyl group, more preferably methyl group.

$R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ , and  $R^{12}$  independently represent a hydrogen atom, a substituted or unsubstituted  $C_1$ - $C_6$  alkyl group, a substituted or unsubstituted aryl group, a substituted or unsubstituted heteroaryl group, a halogen atom, cyano group, carboxyl group, or sulfo group, and two adjacent groups selected from the group consisting of  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ , and  $R^6$  or those selected from the group consisting of  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ , and  $R^{12}$  may independently bind to each other to form a ring. The ring formed may be saturated or unsaturated, and may be a hydrocarbon ring or a heterocyclic ring. For example,  $R^3$  and  $R^4$ ,  $R^4$  and  $R^5$ ,  $R^5$  and  $R^6$ ,  $R^9$  and  $R^{10}$ ,  $R^{10}$  and  $R^{11}$ , or  $R^{11}$  and  $R^{12}$  can bind to each other to form a benzene ring or an aromatic heterocyclic ring such as pyridine ring. Preferred examples include a benzene ring formed by binding of  $R^3$  and  $R^4$ , or  $R^9$  and  $R^{10}$ .

As the aryl group represented by  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ , and  $R^{12}$ , for example, phenyl group or naphthyl group can be used, as the heteroaryl group, for example, thienyl group, benzothienyl group, furyl group, benzofuryl group, pyrrolyl group, imidazolyl group, or quinolyl group can be used. One to four optional substituents may be present on the aryl group and the heteroaryl group. The position of the substituents is not limited, and when two or more substituents are present, they may be same or different. As such substituents, for example, hydroxyl group, a halogen atom such as fluorine atom, chlorine atom, bromine atom, and iodine atom; a  $C_1$ - $C_6$  alkyl group such as methyl group, ethyl group, n-propyl group, isopropyl group, n-butyl group, sec-butyl group, tert-butyl group;  $C_1$ - $C_6$  halogenated alkyl group such as trifluoromethyl group; a  $C_1$ - $C_6$  alkoxyl group such as methoxy group, ethoxy group, n-propoxy group, isopropoxy group, n-butoxy group, sec-butoxy group, tert-butoxy

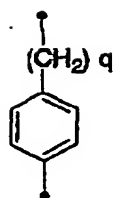
group; a  $C_1-C_6$  alkylenedioxy group such as methylenedioxy group, ethylenedioxy group; carboxyl group; a  $C_1-C_6$  alkoxy carbonyl group; an unsubstituted amino group; a  $C_1-C_6$  alkyl-substituted amino group such as methylamino group, dimethylamino group, ethylamino group; a sulfo group; or a cyano group and the like can be used.

$X^1$  and  $X^2$  independently represent a substituted or unsubstituted  $C_1-C_{16}$  alkyl group or a substituted or unsubstituted aryl group, and  $X^1$  and  $X^2$  have one to four carboxyl groups in total of  $X^1$  and  $X^2$ . As the unsubstituted alkyl represented by  $X^1$  and  $X^2$ , for example, methyl group, ethyl group, propyl group, butyl group, isobutyl group, sec-butyl group, tert-butyl group, pentyl group, isopentyl group, neopentyl group, tert-pentyl group, 2-methylpropyl group, or 1,1-dimethylpropyl group can be used. The alkyl group may be linear, branched, cyclic, or a combination thereof, and a linear or branched alkyl group is preferred.

As the substituted alkyl group represented by  $X^1$  and  $X^2$ , for example, a sulfoalkyl group (such as 2-sulfoethyl group, 3-sulfopropyl group, 3-methyl-3-sulfopropyl group, 4-sulfobutyl group and the like), a carboxyalkyl group (such as 1-carboxymethyl group, 2-carboxyethyl group, 3-carboxypropyl group, 4-carboxybutyl group and the like), a hydroxyalkyl group, an alkoxyalkyl group, an aminoalkyl group, a halogenated alkyl group, a cyanoalkyl group, a heteroaryl-substituted alkyl group, an aryl group, or a heteroaryl group can be used. The alkyl moiety of these groups is the same as those defined in the above-mentioned unsubstituted alkyl group. As the substituted or unsubstituted aryl group represented by  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^7$ , and  $R^8$ , phenyl group, sulfophenyl group, hydroxyphenyl group, or aminophenyl group can be used.

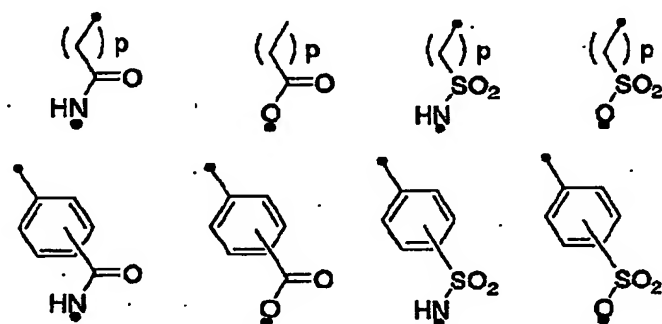
When the number of carboxyl group of  $X^1$  and  $X^2$  is 0 or 1, a  $C_1-C_6$  carboxylalkyl group or a sulfoalkyl group can be used as the  $X^1$  and  $X^2$ .

As the divalent linking group represented by  $Y^1$  and  $Y^2$ , for example, a substituted or unsubstituted  $C_1-C_6$  alkylene group such as methylene group, ethylene group, n-butylene group, methylpropylene group, or phenylene group can be used. As another example, a linking group represented by the following formula can be used:

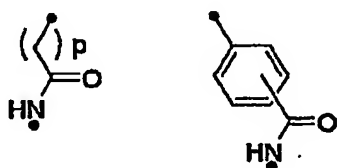


wherein  $q$  represents an integer of 1 to 4, and the symbol "·" represents a bonding position. These hydrocarbon groups may have substituents and may contain one or more hetero atoms. For example, they may contain an ether bond, a thioether bond, a disulfide bond, an amide bond, an ester bond, a sulfoamide bond, or a sulfoester bond.

As the divalent linking group represented by  $Y^1$  and  $Y^2$ , for example, a bond represented by the following formula can also be used:



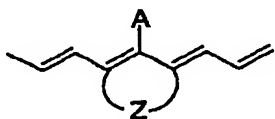
wherein  $p$  represents an integer of 1 to 4, and the symbol "·" represents a bonding position. An preferred example of  $Y^1$  include a linking group represented by the following formula:



wherein  $p$  represents an integer of 1 to 4. Most preferably,  $Y^1$  is  $-(CH_2)_p \cdot CO \cdot NH \cdot$  (wherein  $p$  represents an integer of 1 to 4). Preferred examples of  $Y^2$  include methylene group or ethylene group.

$L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $L^4$ ,  $L^5$ ,  $L^6$ , and  $L^7$  independently represent a substituted or unsubstituted methine group, wherein  $m^1$ ,  $m^2$ , and  $m^3$  independently represent 0 or 1. It is preferred that each of  $m^1$ ,  $m^2$ , and  $m^3$  is simultaneously 1. Examples of the substituent on the methine group include a substituted or unsubstituted alkyl group, a halogen atom, a substituted or unsubstituted aryl group, or a lower alkoxy group and the like. A specific example of the substituted aryl group includes 4-chlorophenyl group and the like. The lower alkoxy group may preferably be a  $C_1$ - $C_6$  alkoxy group which may be linear or branched. Specific examples include methoxy group, ethoxy group, propoxy group, butoxy group, tert-butoxy group, pentyloxy group and the like, and methoxy group or ethoxy group is preferred. As the substituent of the methine group, methyl group or phenyl group can preferably be used.

When the methine groups selected from  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $L^4$ ,  $L^5$ ,  $L^6$ , and  $L^7$  are substituted, the substituents on the methine groups may bind to each other to form a ring. Preferably, the substituents on the methine groups may bind to form a ring containing three successive methine group selected from the group consisting of  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $L^4$ ,  $L^5$ ,  $L^6$ , and  $L^7$ . As an example wherein the substituents on the methine groups bind to each other to form a ring containing three successive methine group selected from the group of  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $L^4$ ,  $L^5$ ,  $L^6$ , and  $L^7$  include, for example, a compound wherein 4,4-dimethylcyclohexene ring is formed to contain  $L^3$ ,  $L^4$ , and  $L^5$ . A particularly preferred example of a partial structure in which a conjugated methine chain formed by methine groups selected from the group of  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $L^4$ ,  $L^5$ ,  $L^6$ , and  $L^7$  contains a ring includes a group represented by the following general formula (a):



wherein Z represents a nonmetallic atom group necessary for forming a 5- or 6-membered ring, and A represents a hydrogen atom or a monovalent group.

Examples of the nonmetallic atom group necessary for forming a 5- to 10-membered ring represented by Z include, for example, a carbon atom, a nitrogen atom, an oxygen atom, a hydrogen atom, a sulfur atom, a halogen atom (fluorine atom,

chlorine atom, bromine atom, iodine atom) and the like. Examples of the 5- or 6-membered ring in the partial structure represented by the general formula (a) include, for example, cyclopentene ring, cyclohexene ring, and 4,4-dimethylhexene ring, and cyclopentene ring or cyclohexene ring is preferred.

Examples of the monovalent group represented by A include, for example, a substituted or unsubstituted alkyl group, a substituted or unsubstituted aryl group, a substituted or unsubstituted aralkyl group, a substituted or unsubstituted lower alkoxy group, a substituted or unsubstituted amino group, a substituted or unsubstituted alkylcarbonyloxy group (such as acetoxy group), a substituted or unsubstituted alkylthio group, a substituted or unsubstituted arylthio group, cyano group, nitro group, a halogen atom and the like.

Specific examples of the aralkyl group represented by A include benzyl group, 2-phenylethyl group, 3-phenylpropyl and the like. Examples of the substituent of the aralkyl group include, for example, sulfo group, carboxyl group, hydroxyl group, a substituted or unsubstituted alkyl group, an alkoxy group, a halogen atom and the like. Specific examples of the substituted amino group represented by A include, for example, an alkylamino group (such as methylamino group, ethylamino group and the like), a dialkylamino group (such as dimethyl amino group, diethylamino group and the like), phenylamino group, diphenylamino group, methylphenylamino group, a cyclic amino group (such as morpholino group, imidazolidino group, ethoxycarbonylpiperadino group and the like). When the substituted amino group has a further substituent, sulfo group, carboxyl group and the like can be used as the substituent. Specific examples of the arylthio group represented by A include phenylthio group, naphthylthio group and the like, and examples of a substituent of the arylthio group include sulfo group, carboxyl group and the like.

Examples of the monovalent group represented by A include phenylamino group, diphenylamino group, ethoxycarbonyl piperazino group, arylthio group and the like.

Y represents a nonmetallic atom necessary for forming a 5- to 10- membered heterocyclic ring, preferably, a 5- or 6- membered heterocyclic ring (the heterocyclic ring may be a condensed ring). Examples of the 5- to 10- membered heterocyclic ring formed by Y include the following rings: thiazole ring (such as thiazole,

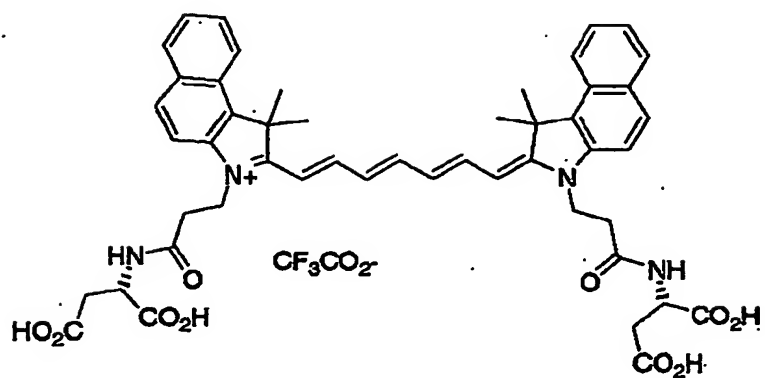
4-methylthiazole and the like), benzothiazole ring (such as benzothiazole, 4-chlorobenzothiazole and the like), naphthothiazole ring (such as naphtho[2,1-d]-thiazole, naphtho[1,2-d]thiazole and the like), thiazoline ring (such as thiazoline, 4-methylthiazoline and the like), oxazole ring (such as oxazole, 4-nitrooxazole and the like), benzoxazole (such as benzoxazole, 4-chlorobenzoxazole and the like), naphthoxazole (such as naphtho[2,1-d]oxazole, naphtho[1,2-d]oxazole and the like), selenazole ring (such as selenazole, 4-phenyl selenazole and the like), benzoselenazole ring (such as benzoselenazole, 4-chlorobenzoselenazole), naphtoselenazole ring (such as naphtho[2,1-d]selenazole, naphtho[1,2-d]selenazole and the like), 3,3-dialkylindolenine ring (such as 3,3-dinitroindolenine, 3,3-diethylindolenine, 3,3-dimethyl-5-nitroindolenine and the like), imidazole ring (such as 1-alkylimidazole, 1-alkyl-4-phenylimidazole and the like), pyridine ring (such as 2-pyridine, 5-methyl-2-pyridine and the like), quinoline ring (such as 2-quinoline, 3-methyl-2-quinoline and the like), imidazo[4,5-b]quinoxaline ring (such as 1,3-diethylimidazo[4,5-b]quinoxaline and the like) and the like. Preferred examples of the 5- to 10-membered heterocyclic ring formed by Y include 3,3-dialkylindolenine ring.

M represents hydrogen atom, a metal, quaternary ammonium salt, or other pharmaceutically acceptable salts. The "pharmaceutically acceptable salts" may be any salt which can form nontoxic salts with the compound represented by the general formula [I]. Examples include, for example, alkaline metal salt such as a sodium salt, a potassium salt and the like; alkaline-earth metal salt such as a magnesium salt, a calcium salt and the like; organic ammonium salt such as a ammonium salt, a triethyl ammonium salt, tributyl ammonium salt, pyridinium salt and the like; salt of amino acid such as lysine salt, arginine salt and the like. Particularly preferred is a sodium salt with a reduced toxicity to a living body.

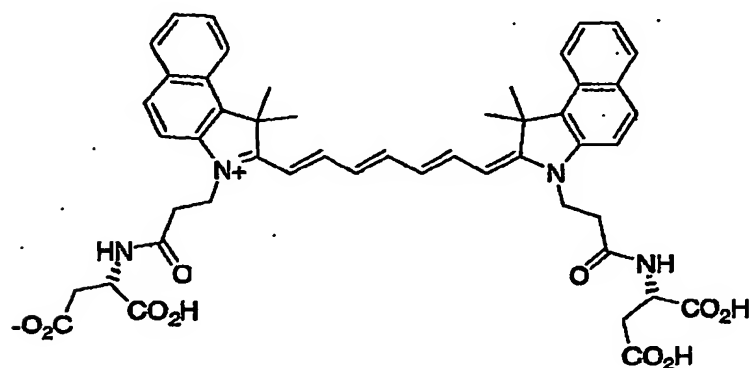
The compound of the present invention may have one or more asymmetric carbon atoms depending on the kind of substituents. Sulfur atoms may act as asymmetric center. Any optical isomers in an optically pure form based on one or more asymmetric carbon atoms, any mixture of the above optical isomers, racemates, diastereomers based on two or more asymmetric carbon atoms, any mixture of the above diastereomers and the like fall within the scope of the present invention.

Specific examples of the compound of the present invention are shown below.  
However, the scope of the present invention is not limited by the following compounds.

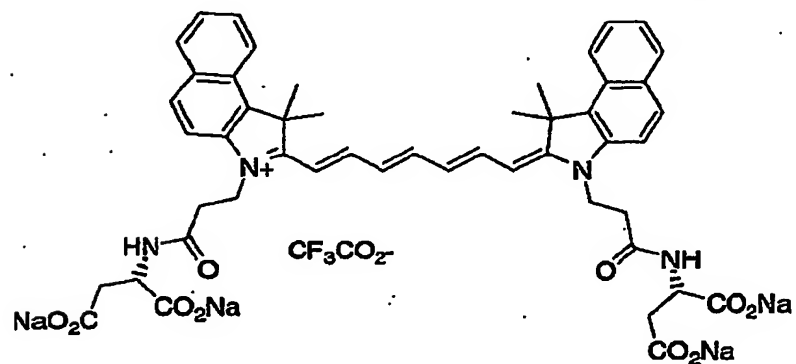
Compound 1



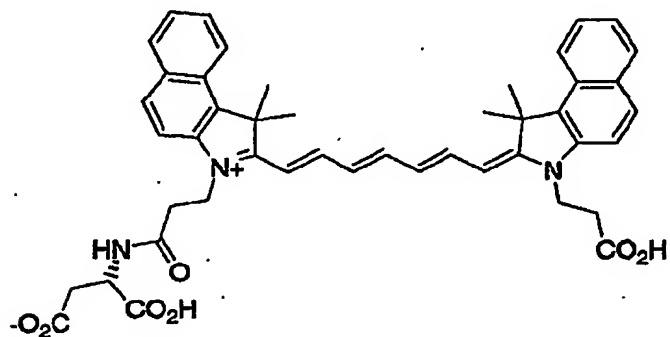
Compound 2



Compound 3

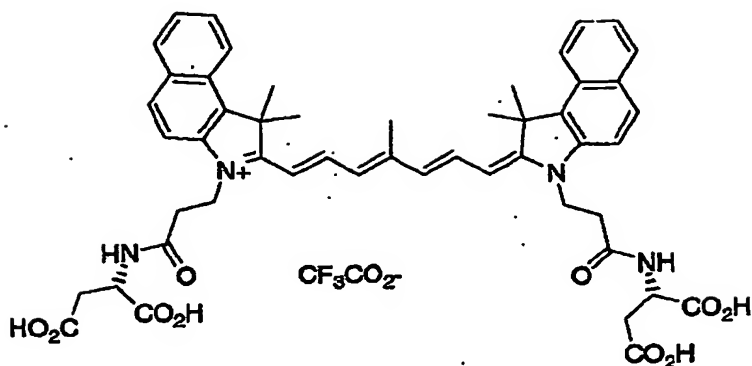


Compound 4

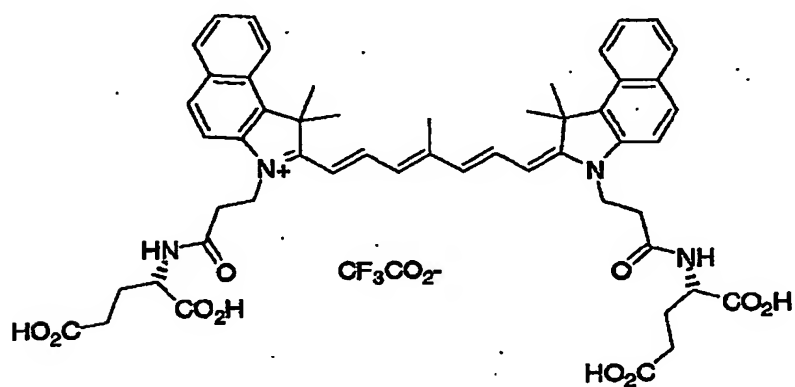




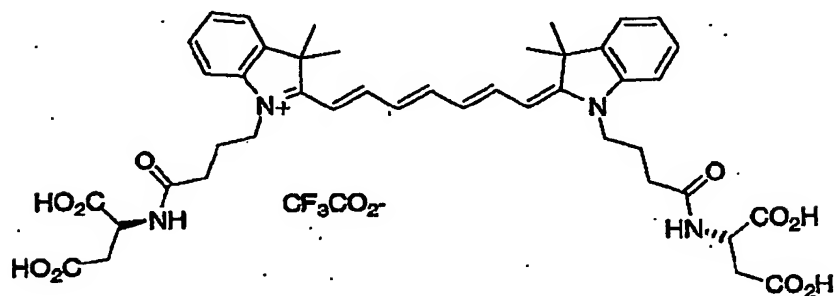
Compound 5



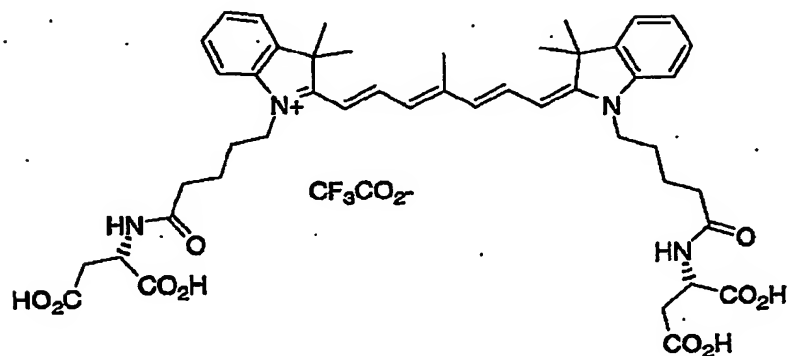
Compound 6



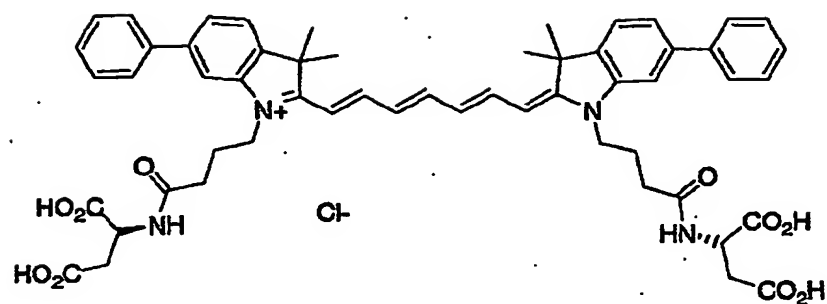
Compound 7



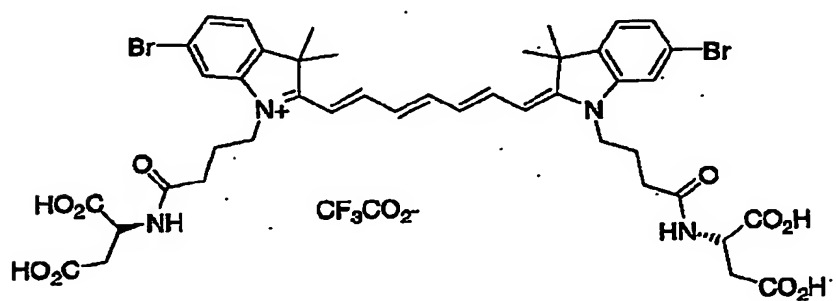
Compound 8



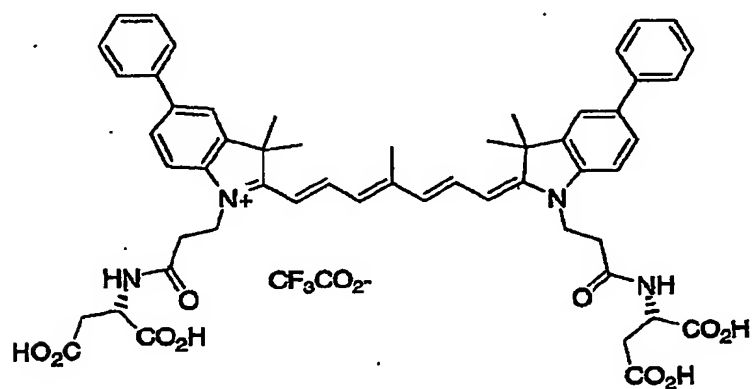
Compound 9



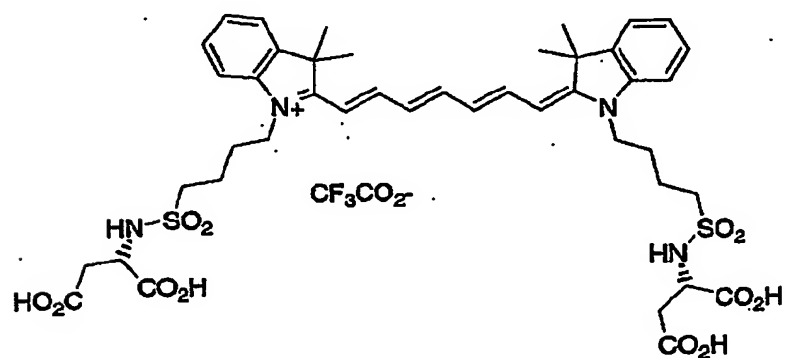
Compound 10



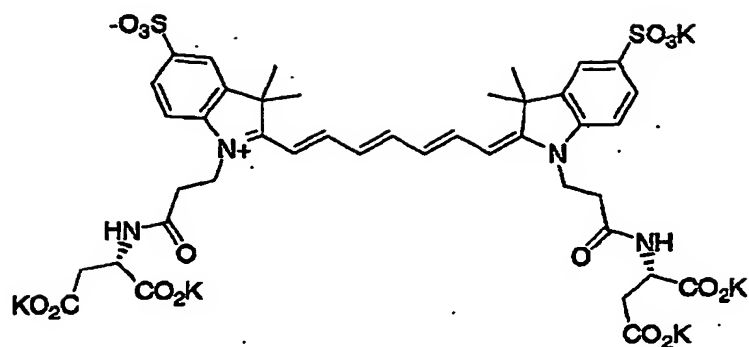
Compound 11



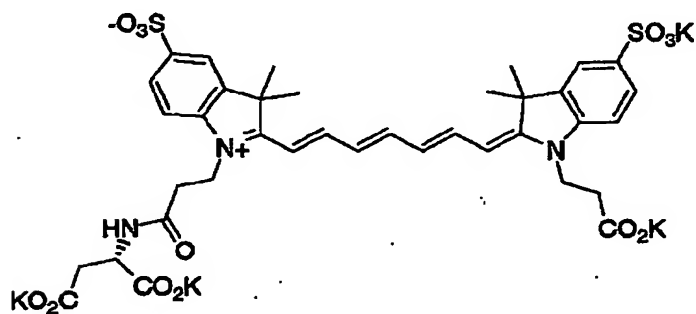
Compound 12



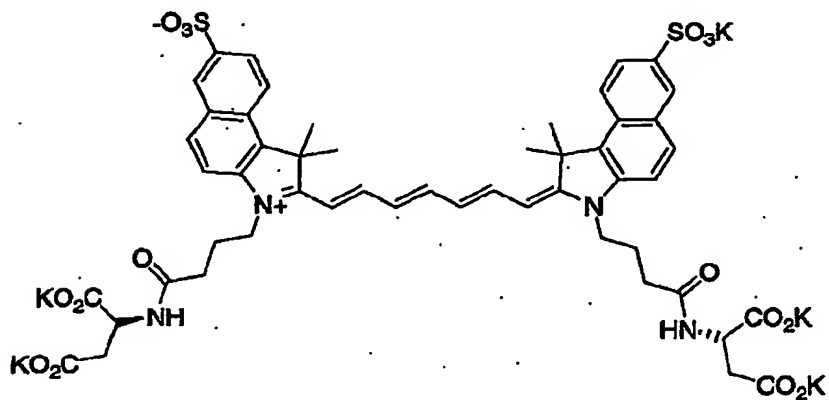
Compound 13



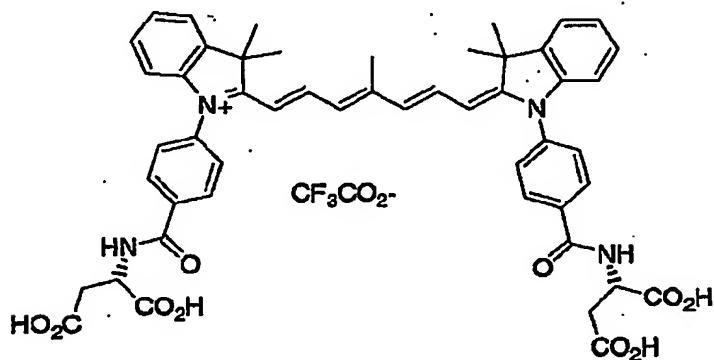
Compound 14



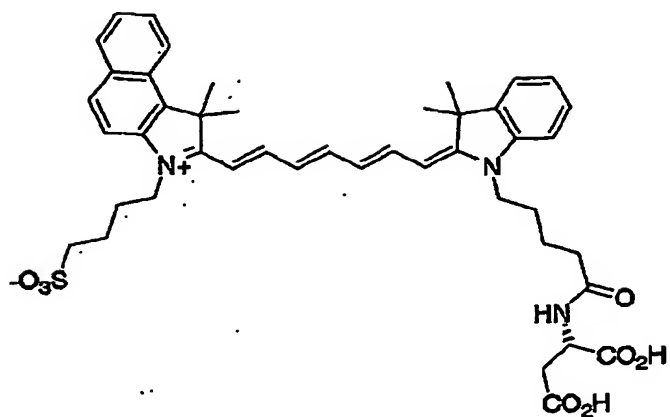
Compound 15



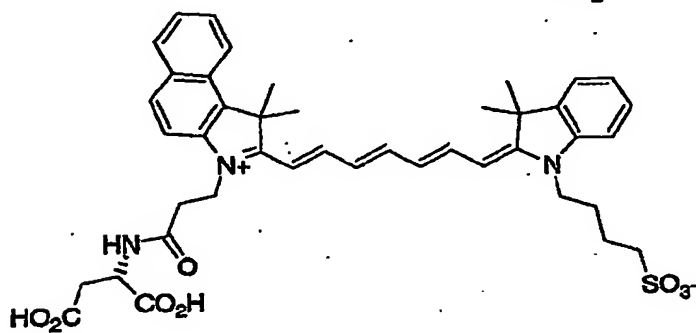
Compound 16



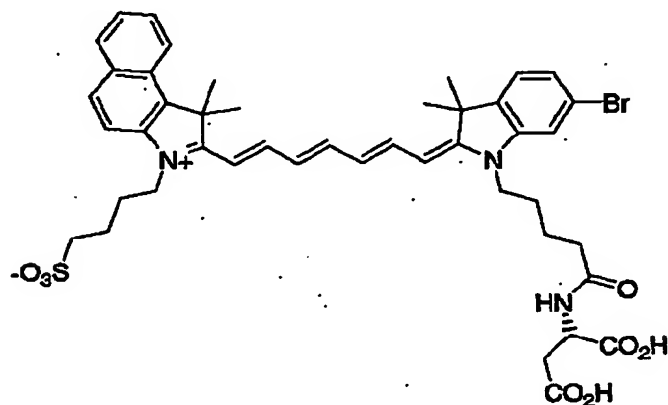
Compound 17



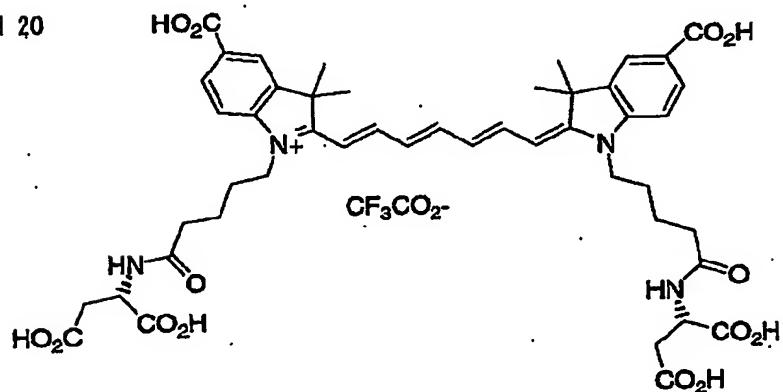
Compound 18



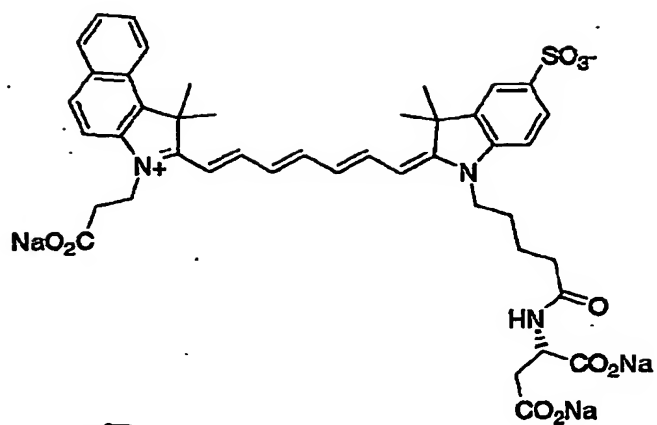
Compound 19



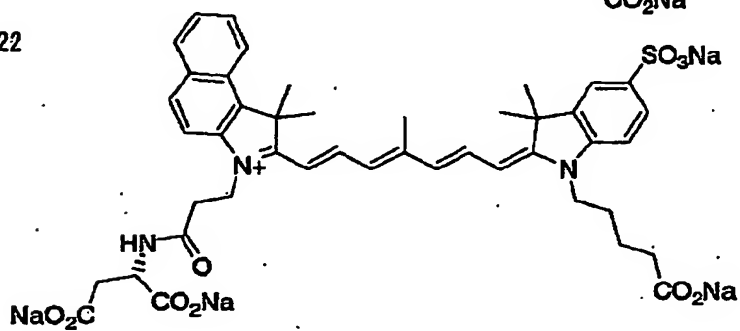
Compound 20



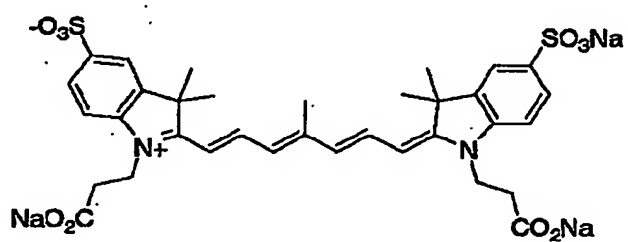
Compound 21



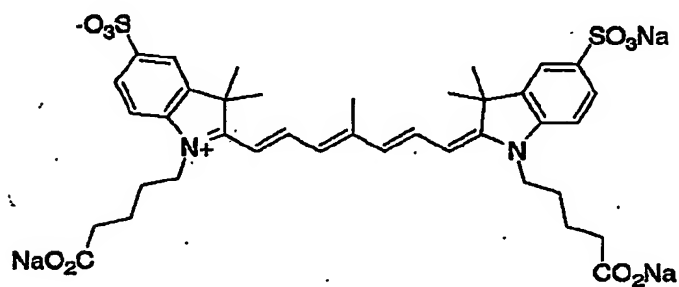
Compound 22



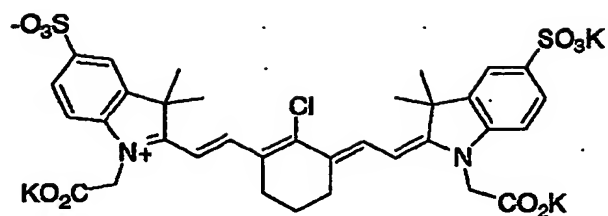
Compound 23



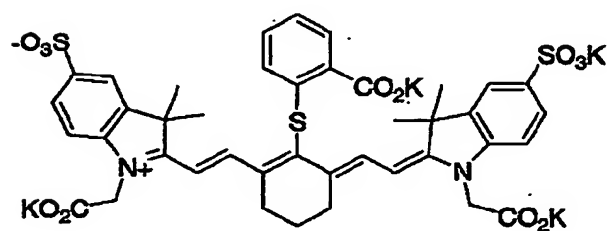
Compound 24



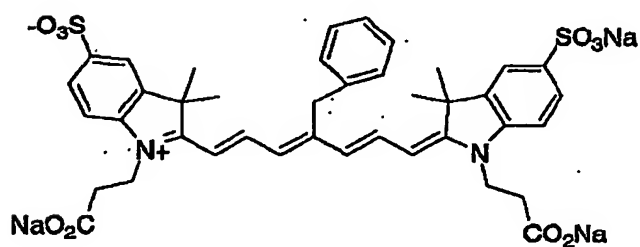
Compound 25



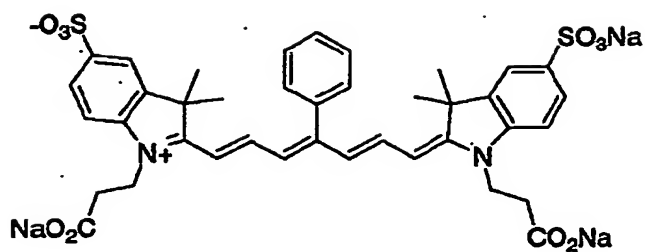
Compound 26



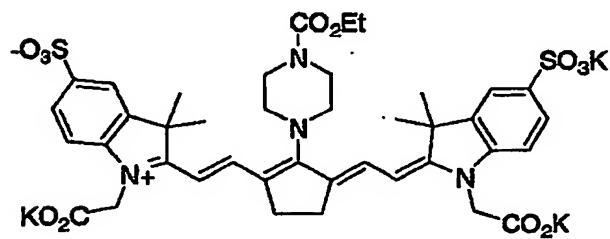
Compound 27



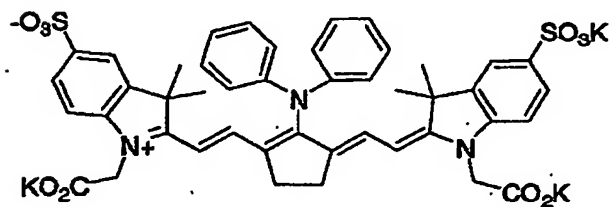
Compound 28



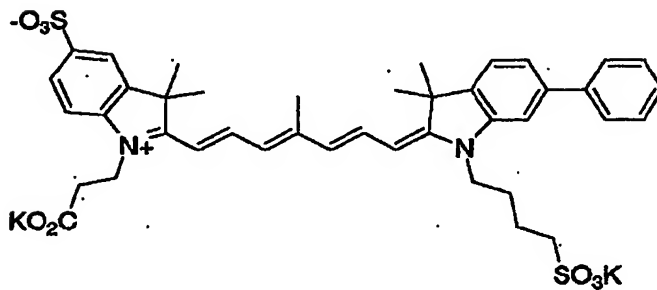
Compound 29



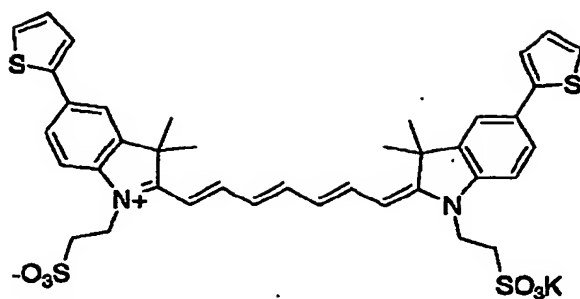
Compound 30



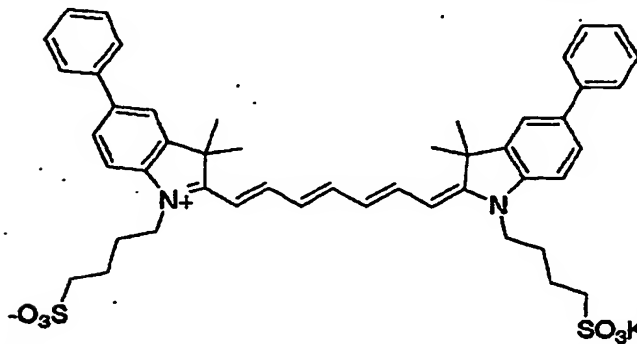
Compound 31



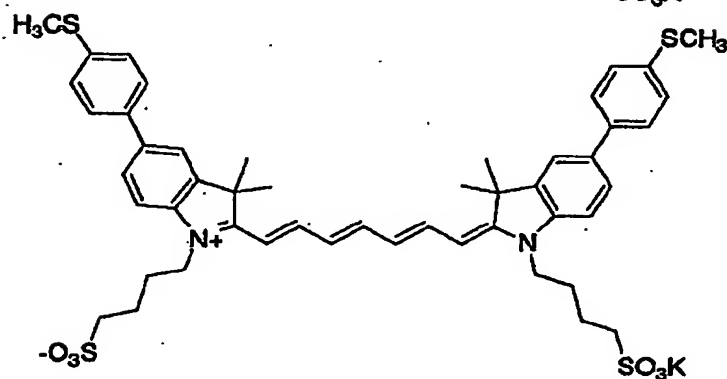
Compound 32



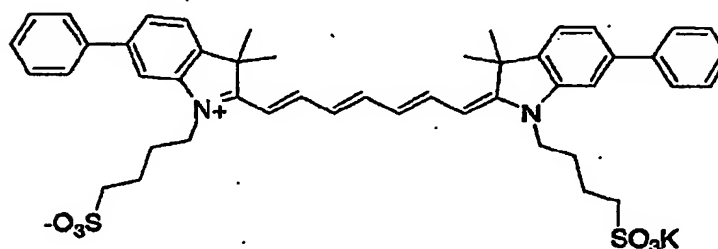
Compound 33



Compound 34



Compound 35



The cyanine dye represented by the formula [I] or [II] can be synthesized according to known preparation methods of cyanine dye compounds, for example, those disclosed in the Cyanine Dyes and Related Compounds, F. M. Hamor, John Wiley and Sons, New York, 1964, Cytometry, 11, 416-430 (1990), Cytometry, 12, 723-730 (1990), Bioconjugate Chem, 4, 105-111 (1993), Anal. Biochem., 217, 197-204 (1994),



Tetrahedron, 45, 4845-4866 (1989), EP-A-0591820A1, EP-A-0580145A1 and the like. Alternatively, they can be semisynthesized from a commercially available cyanine dye compound by known methods. More specifically, they can be synthesized by reacting a diaryl compound with a heterocyclic quaternary salt.

The methods for preparing the cyanine dye compounds represented by the above formula [I] or [II] are not particularly limited, and the compounds can be synthesized by various synthetic routes. Specific preparations of typical compounds of the present invention are disclosed in the Examples of the specification. Accordingly, one of ordinary skill in the art can prepare the cyanine dye compounds that falls within the scope of the above general formulas by referring to the methods described in the Examples, and if necessary, by adding appropriate alteration or modification to the methods and by appropriately choosing starting materials and reagents. For the preparation, a reaction selected from various reactions such as condensation, addition, oxidation, reduction and the like may be employed alone or in combination. These reactions are explained in detail in the literature. For example, various methods or material compounds described as unit synthetic operations in "Jikken Kagaku Kouza" (published by Maruzen, Ltd., each separate volume contained in the first to forth comprehensive edition is available) can be suitably used. In addition, syntheses of the compounds of the present invention are specifically described in the specification of PCT/JP01/06689, whose disclosures are herein incorporated by reference.

For example, where the above defined functional groups may change in a reaction step or they are not suitable to conduct a reaction step in the preparation, a desirable step can be sometimes conducted efficiently by utilizing various methods which are conventionally used in the field of organic synthetic chemistry, for example, means for protection or deprotection of functional groups, or treatments such as oxidation, reduction, hydrolysis and the like. Synthetic intermediate compounds and the target compounds in the above steps can be isolated and purified by conventional purification methods used in organic synthetic chemistry such as filtration, extraction, washing, drying, concentration, recrystallization, and various chromatography and the like. The synthetic intermediate products can be used in the next reaction without isolation.

As the active ingredient of the near infrared fluorescent contrast agent of the

present invention, the compound represented by the general formula [I] or [II] or a salt thereof may be used alone or in combination. More specifically, the active ingredient may be contained in the contrast agent in a form of a suspension or a solution in a solvent such as injectable distilled water, physiological saline, Ringer's solution and the like. Additives such as pharmaceutically acceptable carrier, excipients and the like may also be formulated, if desired. Examples of these additives include substances such as pharmaceutically acceptable electrolytic solutions, buffering solutions, detergents, and substances for adjusting osmotic pressure, substances for improving stability or solubility such as cyclodextrin, liposome and the like. Any additives ordinarily available in the art may be used. The near infrared fluorescent contrast agent of the present invention is preferably synthesized through sterilization processes when used as a medicament for clinical application.

The contrast agent can be administered to a living body by injection, spraying, or topical application such as intravascular application (venous, arterial), oral application, intraperitoneal application, percutaneous application, subcutaneous application, intracystical application, or intrabronchial application. Preferably, the contrast agent may be administered into blood vessels in the form of an aqueous solution, an emulsion or a suspension.

The dose of the near infrared fluorescent contrast agent of the present invention is not particularly limited insofar as the dose enables detection of a site to be diagnosed. The dose may appropriately be increased or decreased depending on the type of the compound to be used that emits near infrared fluorescence, the age, body weight and a target organ of a subjects to be administered and the like. Typically, the dose as the weight of the compound may be 0.1 to 100 mg/kg body weight, preferably 0.5 to 20 mg/kg body weight.

The contrast agent of the present invention may also be appropriately used for various animals other than human. A formulation for administration, the route of administration, a dose and the like may be appropriately chosen depending on the body weight and conditions of the target animals.

The compounds of the present invention represented by the above formula [I] and [II] have properly to highly accumulated in tumor tissues. Utilizing said property, the present invention also provides the fluorescent contrast agent which enables

specific imaging of a tumor tissue. In addition, the class of the compounds of the present invention have long-term retention in blood vessels, and therefore, the fluorescent contrast agent of the present invention is also useful for angiography.

The method for fluorescence imaging of the present invention is characterized by the use of the near infrared fluorescent contrast agent of the present invention. The method for imaging can be carried out by one of ordinary skill in the art according to known methods, and each of parameters such as excitation wavelength and fluorescence wavelength to be detected may appropriately be determined to achieve optimal imaging and evaluation, depending on the kind of near infrared fluorescence contrast agent to be administered and a subject to be administered. The period of time from administration of the near infrared fluorescent contrast agent of the present invention to the start of fluorescence imaging according to the present invention may vary depending on the kind of the near infrared fluorescent contrast agent to be used and a subject to be administered. For example, when the contrast agent comprising a compound of the formula [I] or formula [II] is administered for tumor imaging, a lapse time may be about 10 minutes to 24 hours after administration. When the lapse time is too short, fluorescence from every site may be still too intense and the target site is not distinguishable from other sites, and when the lapse time is too long, the contrast agent may be excreted from the body. When imaging of blood vessel is desired, the compound of the formula [I] or formula [II] is detected immediately after administration or in about 30 minutes after the administration.

For example, the fluorescence imaging can be conducted by the following steps. A near infrared fluorescent contrast agent of the present invention is administered to a subject to be diagnosed, and then the subject is exposed to an excitation light using an apparatus generating excitation light. Then, fluorescence from the near infrared fluorescent contrast agent, which is generated by the excitation light, is detected by using a fluorescence detector. The wavelength for excitation varies depending on the type of the near infrared fluorescent contrast agent to be used, and is not limited as long as the compounds efficiently emits fluorescence in the near infrared region. Preferably, a near infrared light having superior bio-permeability may be used. The wavelength of the near infrared fluorescence to be detected also varies depending on the contrast agent to be used. In general, an excitation light having a wavelength of

600 to 1000 nm, preferably 700 to 850 nm, may be used and near infrared fluorescence having a wavelength of 700 to 1000 nm, preferably, 750 to 900 nm, may be detected. As the apparatus for generating the excitation light, a conventional excitation light source such as various lasers (e.g., ion laser, dye laser and semiconductor laser), halogen light source, xenon light source and the like may be used. Various optical filters may be used to obtain optimal excitation wavelength, if desired. For detection of fluorescence, various optical filters may be used for selection of the fluorescence generated from the near infrared fluorescent contrast agent.

The detected fluorescence is data-processed as fluorescence information to construct fluorescence images to be recorded. Examples of the method for preparation of fluorescence images include, for example, a method comprising the step of irradiating the target tissue in a wide range, detecting fluorescence with a CCD camera, and then image-processing the fluorescence information obtained; a method using an optical CT device; a method using an endoscope; or a method using fundus oculi camera and the like.

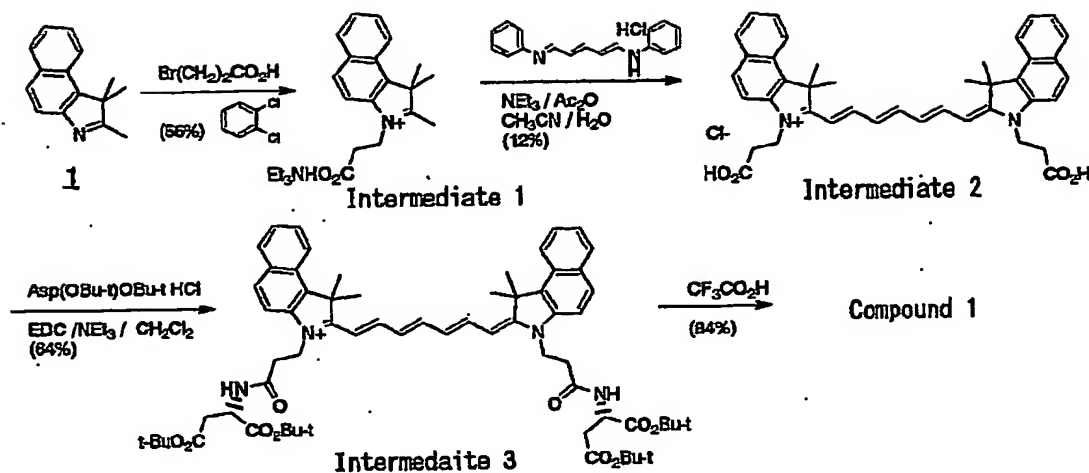
According to the fluorescence imaging method of the present invention, systemic diseases, tumors, blood vessels and the like can be visualized without damaging a living body.

#### Examples

The present invention will be more specifically explained by referring to synthetic examples and a test example. However, the scope of the present invention is not limited to the following examples. In the examples, the serial numbers of the compounds correspond to that of the compounds listed in the above with chemical structures.

#### Example 1: Synthesis of Compound 1, Compound 2, and Compound 3

Synthetic route of Compound 1 is shown below.



### Synthesis of Intermediate 1

The starting material **1** (20.9 g, 0.1 mol), 2-bromopropionic acid (23.0 g, 0.15 mol), and *o*-dichlorobenzene (20 ml) were heated and stirred at 140°C for 2 hours. After the reaction was completed, the reaction mixture was added with acetone (200 ml) and cooled to room temperature, and then the resultant crystal was filtrated to obtain **Intermediate 1** (20.3 g, yield: 56%)

### Synthesis of Intermediate 2

The **Intermediate 1** obtained above (10.0 g, 28 mmol) and 1,7-diaza-1,7-diphenyl-1,3,5-heptatriene hydrochloride (3.9 g, 14 mmol) were dissolved in acetonitrile (70 ml) and water (11 ml), and the resulting solution was added with triethylamine (8.4 g, 91 mmol) and acetic anhydride (8.5 g, 91 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for overnight. The reaction mixture was added to 0.1N hydrochloric acid (900 ml) dropwise and the crystals precipitated were filtrated. The crystal was purified by column chromatography (eluent: methylene chloride : methanol = 95:5 ~ 90:10) to obtain **Intermediate 2** (2.1 g, yield: 12%)

### Synthesis of Intermediate 3

The **Intermediate 2** obtained above (21.0 g, 1.5 mmol), L-aspartic acid-di-*t*-butylester monohydrate (1.3 g, 4.5 mmol), 4-dimethylaminopyridine (40 mg, 0.3 mmol) were dissolved in methylene chloride (50 ml) and the solution was cooled on ice. The resultant solution was added with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-

carbodiimide hydrochloride (EDC) (700 mg, 4 mmol) and triethylamine (340 mg, 3 mmol), and stirred at 4°C for overnight. The reaction mixture was added with methylene chloride (200 ml) and 1N hydrochloric acid (200 ml), and then the methylene chloride layer is extracted and washed with saturated sodium chloride solution (200 ml) and dried over sodium sulfate. The solvent was evaporated under reduced pressure and purified by column chromatography (eluent: ethyl acetate : methanol =95:5 to 80:20) to obtain Intermediate 3 (1.1g, yield: 64%)

#### Synthesis of Compound 1, Compound 2, and Compound 3

Intermediate 3 (500 mg, 0.5 mmol) was dissolved in trifluoroacetic acid (5 ml) and reacted at 4°C for overnight, and then trifluoroacetic acid was evaporated under reduced pressure. The resulting residue was added with water (50 ml) and then the resulting crystals were collected by filtration and washed with water and ethyl acetate to obtain Compound 1 (390 mg, yield: 90%).

Compound 1 was purified by column chromatography using Sephadex (LH-20, Pharmacia) (eluent: methanol) to obtain Compound 2.

Compound 1 was applied to an ion exchange resin column CR 11 (Mitsubishi Chemical, Co., Ltd.) to obtain Compound 3.

#### Compound 1

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.98 (s, 12H), 2.70 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 2.80 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 3.30 (MeOH), 4.50 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.60 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 4.80 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 6.40 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.63 (dd,  $J=13.2, 13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.40-7.50 (m, 2H), 7.58-7.66 (m, 5H), 7.95-8.07 (m, 6H), 8.20 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H)

#### Compound 2

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.99 (s, 12H), 2.72 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 2.80 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 3.30 (MeOH), 4.50 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.60 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 4.80 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 6.38 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.61 (dd,  $J=13.2, 13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.40-7.50 (m, 2H), 7.58-7.67 (m, 5H), 7.96-8.07 (m, 6H), 8.21 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H)

#### Compound 3

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.98 (s, 12H), 2.56-2.65 (m, 4H), 2.75-2.85 (m, 4H), 3.30 (MeOH), 4.45-4.50 (m, 4H), 4.80 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 6.20 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.65 (dd,  $J=13.2$ ,  $13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.40-7.50 (m, 2H), 7.58-7.70 (m, 5H), 7.95-8.07 (m, 6H), 8.20 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H)

#### Example 2: Synthesis of Compound 5

Compound 5 was synthesized from Intermediate 1 and 1,7-diaza-5-methyl-1,7-diphenyl-1,3,5-heptatriene monohydrate in a similar manner to that for Compound 1.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  2.00 (s, 12H), 2.44 (s, 3H), 2.73 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 2.82 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 3.31 (MeOH), 4.50 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.69 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 4.88 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 6.41 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.65 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.43-7.50 (m, 2H), 7.58-7.67 (m, 4H), 7.95-8.05 (m, 4H), 8.10-8.27 (m, 4H)

#### Example 3: Synthesis of Compound 6

Compound 6 was synthesized from Intermediate 1 and 1,7-diaza-5-methyl-1,7-diphenyl-1,3,5-heptatriene monohydrate in a similar manner to that for Compound 1 except that L-glutamic acid-di-t-butylester monohydrate was used instead of L-aspartic acid-di-t-butylester monohydrate.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.80-2.15 (m, 4H), 2.01 (s, 12H), 2.28 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 2.44 (s, 3H), 2.82 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 3.31 (MeOH), 4.40-4.50 (m, 2H), 4.51 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.88 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 6.42 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.65 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.42-7.50 (m, 2H), 7.57-7.67 (m, 4H), 7.95-8.05 (m, 4H), 8.10-8.27 (m, 4H)

#### Example 4: Synthesis of Compound 7

Compound 7 was synthesized from 2,3,3-trimethylindolenine in a similar manner to that for Compound 1.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.70 (s, 12H), 2.05-2.13 (m, 4H), 2.55 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 2.78-2.92 (m, 4H), 3.30 (MeOH), 4.10 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.89 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 6.45 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.50 ( $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.29-7.50 (m, 8H), 7.92 (dd,  $J=13.2$ ,  $13.2\text{Hz}$ , 2H)

#### Example 5: Synthesis of Compound 8

Compound 8 was synthesized from 2,3,3-trimethylindolenine in a similar

manner to that for Compound 1 except that 1,7-diaza-5-methyl-1,7-diphenyl-1,3,5-heptatriene monohydrochloride was used instead of 1,7-diaza-1,7-diphenyl-1,3,5-heptatriene monohydrate.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.70 (s, 12H), 1.72-1.90 (m, 8H), 2.35-2.39 (m, 7H), 2.73-2.84 (m, 4H), 3.30 (MeOH), 4.08 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.66 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 4.89 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 6.33 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.63 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.18-7.50 (m, 8H), 8.05 (dd,  $J=13.2$ , 13.2 Hz, 2H)

#### Example 6: Synthesis of Compound 9

Compound 9 was synthesized from 6-phenyl-2,3,3-trimethylindolenine (synthesized by a method described in the specification of the U.S. Patent No. 6,004,536) in a similar manner to that for Compound 1.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.75 (s, 12H), 2.05-2.15 (m, 4H), 2.45-2.55 (m, 4H), 2.75-2.84 (m, 4H), 3.30 (MeOH), 4.20 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.80 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 6.38 ( $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.62 ( $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.43-7.70 (m, 17H), 7.95 (dd,  $J=13.2$ , 13.2 Hz, 2H)

#### Example 7: Synthesis of Compound 10

Compound 10 was synthesized from 6-bromo-2,3,3-trimethyl-indolenine in a similar manner to that for Compound 1.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.68 (s, 12H), 2.00-2.15 (m, 4H), 2.40-2.55 (m, 4H), 2.77-2.92 (m, 4H), 3.30 (MeOH), 4.08 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.82 (m, 2H), 6.38 ( $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.65 ( $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.30-7.40 (m, 4H), 7.50-7.72 (m, 3H), 7.90-8.02 (m, 2H)

#### Example 8: Synthesis of Compound 11

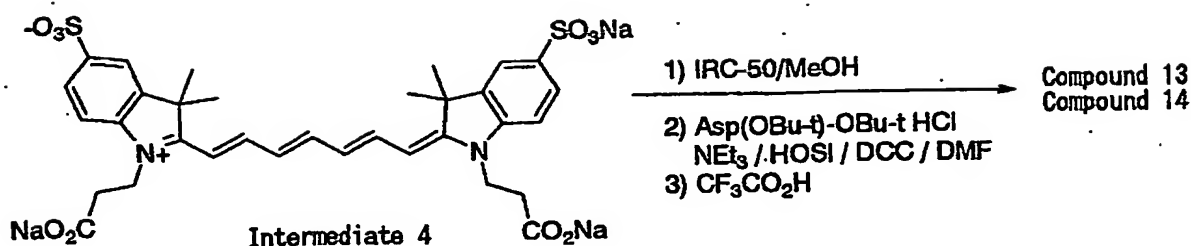
Compound 11 was synthesized from 5-phenyl-2,3,3-trimethyl-indolenine in a similar method to that for Compound 1.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.78 (s, 12H), 2.39 (s, 3H), 2.70-2.84 (m, 8H), 3.30 (MeOH), 4.30-4.46 (m, 4H), 4.60-4.68 (m, 2H), 6.39 ( $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.66 ( $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.30-7.48 (m, 9H), 7.56-7.72 (m, 3H), 8.05 ( $J=13.2\text{Hz}$ , 13.2Hz)

#### Example 9: Synthesis of Compound 13 and Compound 14

Synthetic route of Compound 13 and Compound 14 is shown below.





An intermediate compound (375 mg), which was obtained by reacting 5-sulfo-2,3,3-trimethylindolenine (prepared according to the method described in the Japanese Patent Unexamined Publication (KOKAI) No.(Hei)2-233658) and 1,7-diaza-1,7-diphenyl-1,3,5-heptatriene monohydrochloride in methanol in the presence of triethylamine and acetic anhydride, was dissolved in 5 ml of methanol, and then applied to a column filled with cationic ion exchange resin IRC-50 (Organo, eluent: methanol). The solvent was evaporated to give the proton form of the carboxylic acid. The resulting product was dissolved in 3 ml of dimethylformamide, and the solution was added with 338 mg (1.2 mmol) of dibutyl aspartate hydrochloride, 24 mg (0.2 mmol) of dimethylaminopyridine, and 121 mg (1.2 mmol) of triethylamine, and then the mixture was cooled on ice bath. The mixture was added with 230 mg (2 mmol) of hydroxysuccinimide (HOSI) and 288 mg (1.4 mmol) of N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), and the resulting mixture was stirred overnight. The reaction mixture was added with 200 ml of a mixed solvent of ethyl acetate/hexane (1:1) and crystals precipitated were collected by filtration. The crystals were purified by column chromatography (eluent: methylene chloride:methanol=10:1 to 2:1) to obtain diamide compound (135 mg) and monoamide compound (94 mg).

Each of the resulting diamide compound (120 mg) and monoamide compound (60 mg) was dissolved in 2 ml of trifluoroacetic acid, and then the mixture was stirred at room temperature for 1 hour. The reaction mixture was dissolved in water/methanol (1/1(v/v)) and purified by column chromatography using Sephadex (LH-20, Pharmacia, eluent: methanol). The resulting crystals were dissolved in a small volume of methanol, and the solution was added with a saturate solution of potassium acetate in methanol. Crystals precipitated were collected by filtration to

obtain Compound 13 (35 mg, yield 7%) and Compound 14 (15 mg, yield 5%).

#### Compound 13

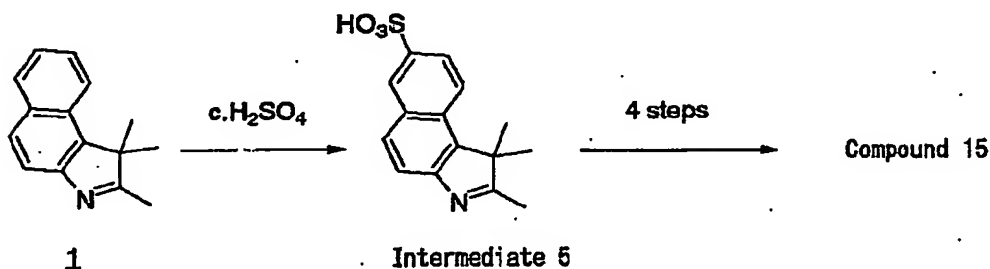
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  1.73 (s, 12H), 2.50-2.65 (m, 4H), 2.68-2.73 (m, 4H), 4.28-4.38 (m, 4H), 4.39-4.50 (m, 2H), 4.90 ( $\text{D}_2\text{O}$ ), 6.47 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.74 (t,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.40-7.50 (m, 2H), 7.60 (t,  $J=13.2\text{Hz}$ , 1H), 7.80-8.05 (m, 6H)

#### Compound 14

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  1.65 (s, 6H), 1.70 (s, 6H), 2.40 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 2.58 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 2.70 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 4.18-4.30 (m, 4H), 4.90 ( $\text{D}_2\text{O}$ ), 6.18 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 1H), 6.34 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 1H), 6.48-6.62 (m, 2H), 7.20 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 1H), 7.30 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 1H), 7.48 (t,  $J=13.2\text{Hz}$ , 1H), 7.68-7.95 (m, 6H)

#### Example 10: Synthesis of Compound 15

Synthetic route of Compound 15 is shown below.



The starting material (41.8 g, 0.2 mol) was dissolved in conc. sulfuric acid (156 ml, 2.9 mol) and reacted at  $140^\circ\text{C}$  for 1 hour, and then the mixture was cooled to  $80^\circ\text{C}$ . After the resulting solution was added to ice water (300 ml), a solution obtained by dissolving sodium hydroxide (96.6 g, 2.4 mol) in water (100 ml) was carefully added to the mixture. The crystals precipitated were collected by filtration and washed with water (120 ml). The resulting crude crystal was added with water (300 ml) and methanol (100 ml), and the mixture was refluxed under stirring for 30 minutes, and then cooled to room temperature. The resulting crystals were collected by filtration and washed with water (100 ml) and methanol (120 ml) to obtain Intermediate 5 (37.9

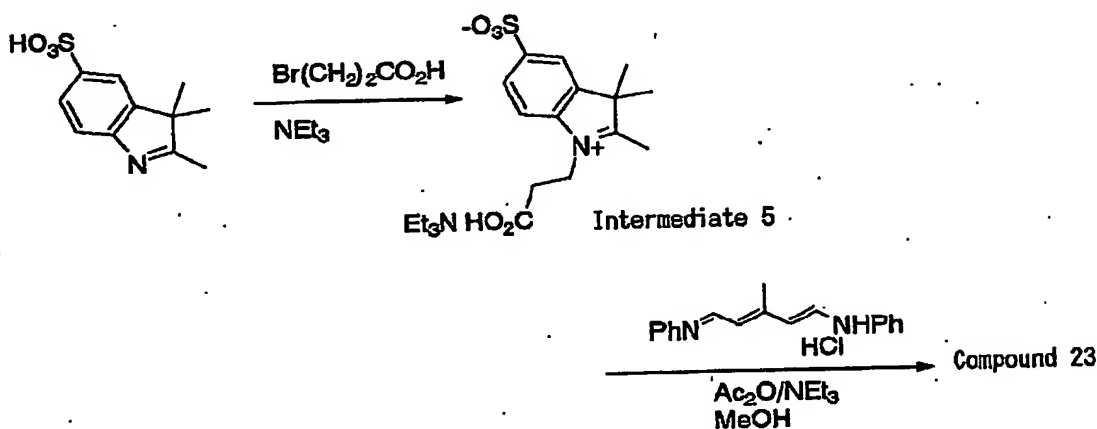
g, yield: 66%).

Compound 15 was obtained from Intermediate 5 in a similar method to that for Compound 13.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  2.00 (s, 12H), 2.72 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 2.82 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 3.30 (MeOH), 4.58 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.70 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.86 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 6.42 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.62 (dd,  $J=13.2, 13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.62-7.70 (m, 3H), 7.95-8.12 (m, 6H), 8.28 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 8.42 (s, 2H)

#### Example 11: Synthesis of Compound 23

Synthetic route of Compound 23 is shown below.



#### Synthesis of Intermediate 6

5-Sulfo-2,3,3-trimethylindole (synthesized according to the method described in Japanese Patent Unexamined Publication (KOKAI) No. (Hei) 2-233658) (24.0 g, 0.1 mol), 2-bromopropionic acid (23.0 g, 0.15 mol) and triethylamine (10.1 g, 0.1 mol) were heated and stirred at  $160^\circ\text{C}$  for 6 hours. After the reaction was completed, the reaction mixture was added with methanol (200 ml) and cooled to room temperature, and then the resulting crystals were collected by filtration to obtain Intermediate 6 (6.0 g, yield: 19.3%).

#### Synthesis of Compound 23

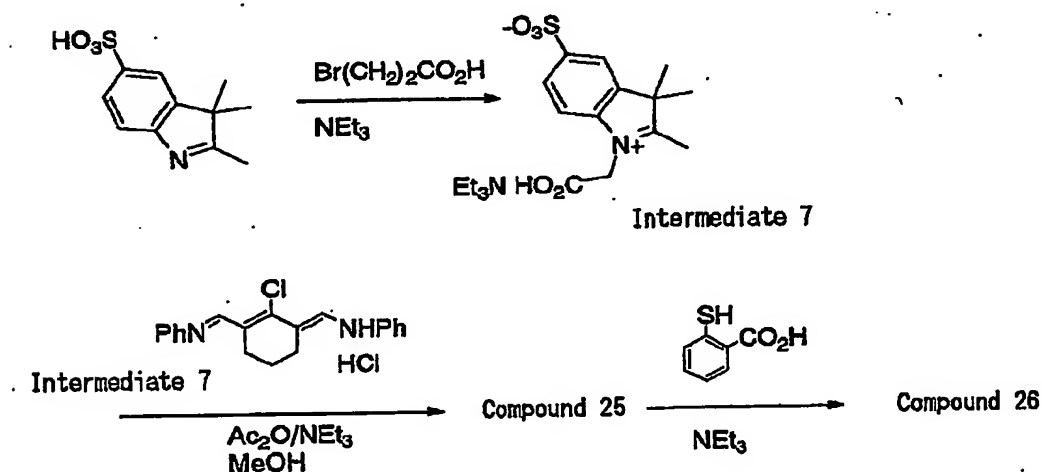
The Intermediate 1 (3.1 g, 10 mmol) obtained above and 1,7-diaza-

1,7-diphenyl-4-methyl-1,8,5-heptatriene monohydrochloride (Japanese Patent Unexamined Publication (KOKAI) No. (Hei) 8-295658) (1.5 g, 5 mmol) were dissolved in methanol (20 ml), and the resulting solution was added with triethylamine (2.5 g, 25 mmol) and acetic anhydride (4.6 g, 45 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for 3 hours. The reaction mixture was added with sodium acetate (3.3 g, 33 mmol) and stirred at room temperature for 30 minutes. The resulting crystals were collected by filtration and washed with methanol (20 ml) to obtain Compound 23 (2.0 g, yield: 50.0%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm) 1.60 (s, 12H), 2.30 (s, 3H), 2.60 (t, 4H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 4.20 (t, 4H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 6.25 (d, 2H,  $J=14.5\text{Hz}$ ), 6.55 (dd, 2H, 14.5, 14.5Hz), 7.25 (d, 2H,  $J=7.0\text{Hz}$ ), 7.70-7.80 (m, 4H), 8.00 (dd, 2H,  $J=14.5$ , 14.5Hz)

#### Example 12: Synthesis of Compound 25 and Compound 26

The synthetic route of Compound 25 and Compound 26 is shown below.



#### Synthesis of Intermediate 7

Intermediate 7 was synthesized from 5-sulfo-2,3,3-trimethylindolenine and bromoacetic acid in a similar method to that for Intermediate 6 (16.6 g).

#### Synthesis of Compound 25

Compound 25 was synthesized from Intermediate 7 and Intermediate 8 (obtained according to the method described in Zh. Org. Khim., 18, pp.1189-1192, 1977)

in a similar method to that for Compound 23 (15.0 g).

MS(FAB<sup>-</sup>, Glycerin)  $m/z$  = 844

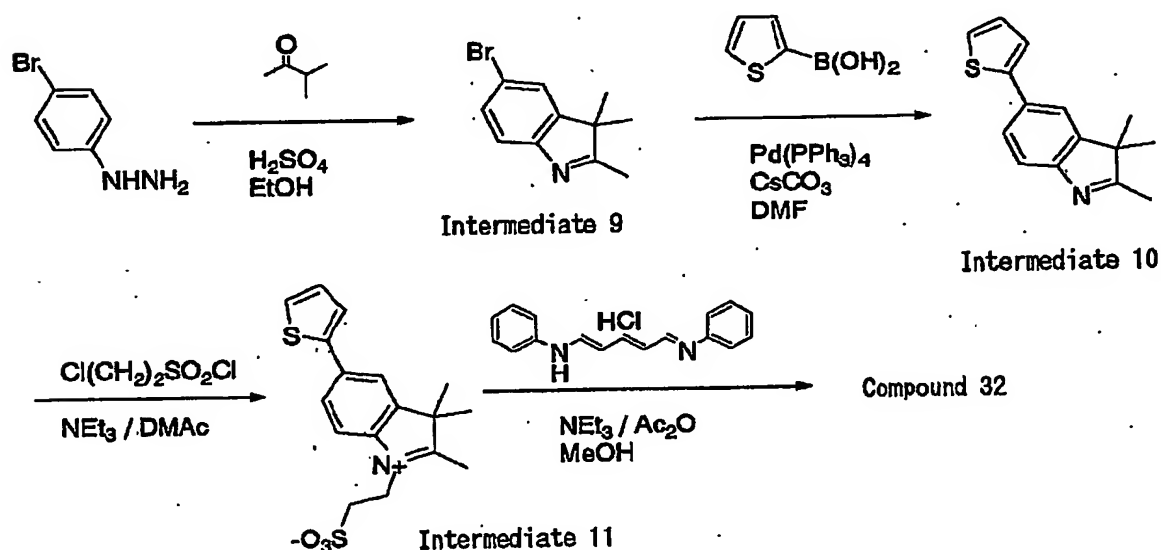
#### Synthesis of Compound 26

Compound 25 (4.2 g, 5 mmol) and triethylamine (1.0g) was added to water (20 ml) and then the obtained solution was added with o-mercaptobenzoic acid (0.93 g, 6 mmol) and stirred at room temperature for 1 hour. The obtained mixture was added with potassium acetate (2.0 g, 20 mmol), and then added with ethanol (20 ml), the resultant crystal was filtered to obtain Compound 26 (1.8 g, yield: 27%)

MS (FAB<sup>-</sup>, Glycerin)  $m/z$  = 962

#### Example 13: Synthesis of Compound 32

Synthetic route of Compound 32 is shown below.



#### Synthesis of Intermediate 9

4-Bromophenylhydrazine monohydrochloride (73.8 g, 0.33 mmol) and 3-methyl-2-butanone (33.2 g, 0.40 mmol) were dissolved to ethanol (450 ml) and the resulting solution was added with conc. sulfuric acid (7.5 ml) and refluxed under stirring for 8 hours. After the mixture was cooled to room temperature, the solution was concentrated to 100 ml under reduced pressure. To the residue, water (400 ml)

and ethyl acetate (400 ml) were added, and then pH of the aqueous layer was adjusted to 7 to 8 with sodium hydroxide solution. The resulting solution was extracted with ethyl acetate, washed with saturated sodium chloride solution, and dried over anhydrous sodium sulfate. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography (eluent: hexane : ethyl acetate=5:1 to 1:1) to obtain Intermediate 9 as a brown liquid (58.6 g, yield 76%)

#### Synthesis of Intermediate 10

Intermediate 9 (4.76 g, 20 mmol) and thiophene boronic acid (3.84 g, 30 mmol) are added to dimethyl formamide (50 ml) and the resulting solution was added with palladium tetrakis phenylphosphine (1.16 g, 9 mmol) and cesium chloride (13.3 g, 40 mmol) and heated and stirred under nitrogen atmosphere at 100°C for 4 hours. After water (200 ml) was added, the mixture was extracted with ethyl acetate (200 ml) and washed with saturated sodium chloride solution, and then the organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluent : hexane : ethyl acetate =2:1 to 1:1) to obtain Intermediate 10 as a brown solid (2.8 g, yield: 58%).

#### Synthesis of Intermediate 11

Intermediate 10 (1.40 g, 6 mmol) and triethylamine (0.59 g, 6 mmol) are added to dimethyl formamide (3 ml), and the mixture was added dropwise with 2-chloroethane sulfonylchloride (1.42 g, 9 mmol) under ice cooling. After stirring was continued at room temperature for 30 minutes, the solution was added with a solution obtained by dissolving sodium hydroxide (0.23 g, 6 mmol) to water (2 ml) and further stirred at room temperature for 1 hour. To the mixture, ethyl acetate was added, and the upper layer was removed by decantation. The residue was dried to obtain Intermediate 11. The Intermediate 11 was used in the next reaction without further purification.

#### Synthesis of Compound 32

The Intermediate 11 obtained above and 1,7-diaza-1,7-diphenyl-1,3,5-heptatriene monohydrochloride were dissolved in methanol (5 ml) and the resulting

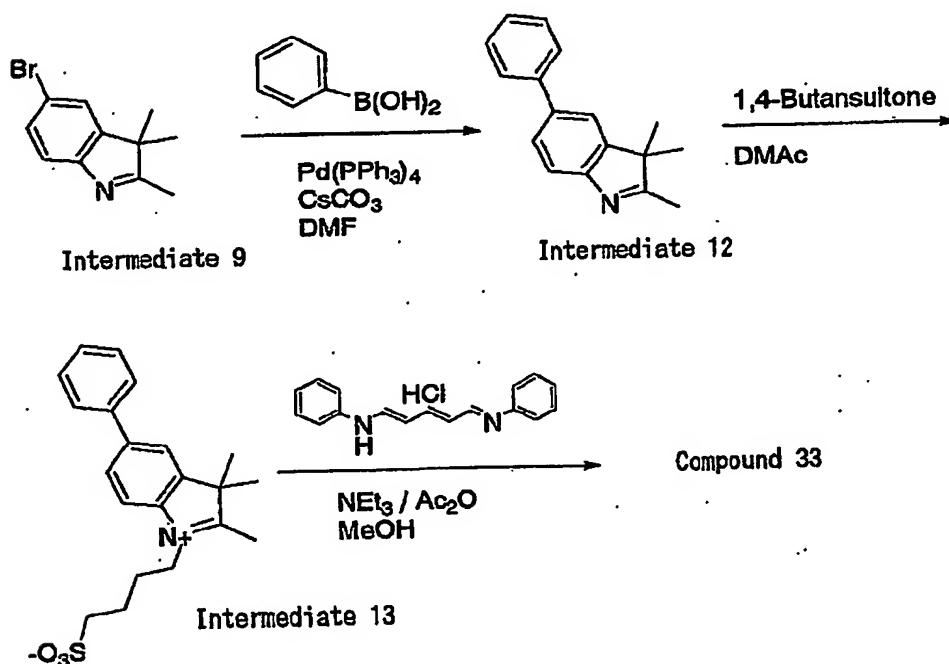
solution was added with triethylamine (160 mg, 2 mmol) and anhydrous acetic acid (230 mg, 2 mmol), and then the mixture was stirred at room temperature for 7 hours. This mixture was added with ethyl acetate (20 ml) and the crystals precipitated were collected by filtration and washed with ethyl acetate (10 ml). This crystals were dissolved in methanol (10 ml) and then the solution was added with a saturated solution of potassium acetate in methanol (10 ml). The crystals precipitated were collected by filtration and washed with methanol (5 ml). The crystals were purified by Sephadex LH-20 (diluent : methanol) to obtain Compound 32 (15 mg, yield: 2% (from Intermediate 2)).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 1.75 (s, 12H), 3.25 (t, 4H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 4.50 (t, 4H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 6.40 (d, 2H,  $J=14.5\text{Hz}$ ), 6.63 (dd, 2H, 14.5, 14.5Hz), 7.07-7.12 (m, 2H), 7.33-7.45 (m, 6H), 7.53-7.75 (m, 5H), 7.96 (dd, 2H,  $J=14.5$ , 14.5Hz)

MS(FAB-, Glycerin)  $m/z = 760$

#### Example 14: Synthesis Compound 33

The synthetic route of compound 33 is shown below.



Synthesis of Intermediate 12

Intermediate 12 was synthesized from Intermediate 9 and dihydroxyphenyl borane in a similar method of that for Intermediate 10 (3.6 g, yield: 77%).

#### Synthesis of Intermediate 13

Intermediate 12 (1.40 g, 6 mmol) and 1,4-butanediol (1.22 g, 9 mmol) were dissolved in dimethyl acetamide (2 ml) and the solution was stirred at 135°C for 5 hours. The solution was added with ethyl acetate (20 ml) and cooled to room temperature, and then the crystals precipitated were filtered and washed with ethyl acetate to obtain Intermediate 13 (10 ml) (1.84 g, yield: 84%).

#### Synthesis of Compound 33

Intermediate 13 (1110 mg, 3 mmol) and 1,7-diaza-1,7-diphenyl-1,3,5-heptatriene monohydrochloride (285 mg, 1 mmol) were dissolved in methanol (5 ml), and the resulting solution was added with triethylamine (480 mg, 5 mmol) and anhydrous acetic acid (670 mg, 7 mmol) and then stirred at room temperature for 7 hours. Ethyl acetate (10 ml) was added to the reaction mixture and crystals precipitated were collected by filtration and washed with ethyl acetate (10 ml). The crystals were dissolved in methanol (5 ml) and added with a saturated solution of potassium acetate in methanol (10 ml), and the crystals precipitated were filtered and washed with 5 ml. The crystal was purified by Sephadex LH-20 (diluent: methanol) to obtain Compound 33 (250 mg, yield: 30%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm). 1.80 (s, 12H), 1.95-2.05 (m, 8H), 2.90 (t, 4H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 4.20 (t, 4H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 6.38 (d, 2H,  $J=14.5\text{Hz}$ ), 6.62 (dd, 2H, 14.5, 14.5Hz), 7.30-7.48 (m, 8H), 7.60-7.74 (m, 9H), 7.93 (dd, 2H,  $J=14.5, 14.5\text{Hz}$ )  
MS(FAB-, Nitrobenzylalcohol)  $m/z$  = 803

#### Example 15: Synthesis of Compound 34

Compound 34 was synthesized from Intermediate 9 and 4-methyl mercaptophenyl boronic acid in a similar method to that for Compound 33 (15 mg).

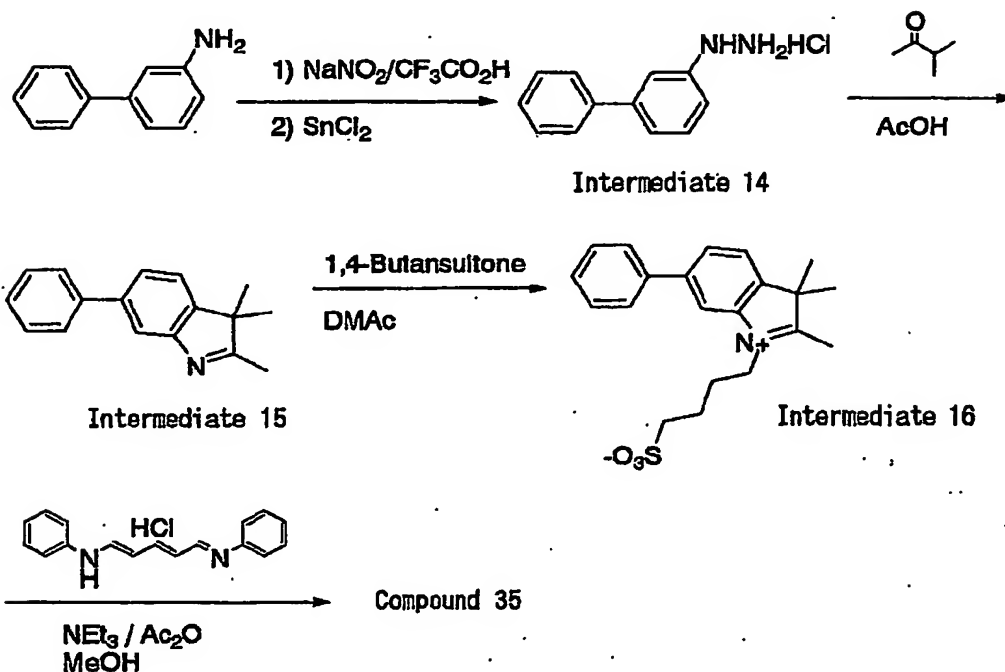
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 1.68 (s, 12H), 1.95-2.10 (m, 8H), 2.50 (s, 6H), 3.00 (t, 4H,



$J=7.2\text{Hz}$ ), 4.10 (t, 4H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 6.30 (d, 2H,  $J=14.5\text{Hz}$ ), 6.62 (dd, 2H, 14.5, 14.5Hz), 7.20-7.70 (m, 19H)

#### Example 16 : Synthesis of Compound 35

Synthetic route of Compound 35 is shown below.



#### Synthesis of Intermediate 14

25.0 g of 3-aminodiphenyl (0.15 mol) was added to 100 ml of trifluoroacetic acid, and the mixture was cooled to the internal temperature of 0°C. The mixture was added dropwise with a solution obtained by dissolving 10.2 g of sodium nitrite (0.15 mol) in 100 ml of water while the temperature of the reaction mixture was kept below 5°C. After the dropwise addition was completed, the mixture was stirred at the same temperature for 15 minutes, and then the mixture was added with a solution obtained by dissolving 100 g of stannic chloride (0.54 mol) in 50 ml of concentrated hydrochloric acid while the temperature of the reaction mixture was kept below 10°C. After the completion of the dropwise addition, the crystals precipitated by addition of 250 ml of water were collected by filtration and washed with 200 ml of methylene chloride. The resulting Intermediate 14 was dried and used for the synthesis of Intermediate 15

without purification.

#### Synthesis of Intermediate 15

The above-obtained Intermediate 14 (whole amount) and 12.9 g of 3-methyl-2-butanone (0.15 mol) were added to 140 ml of acetic acid, and the mixture was heated under stirring for 2 hours and 30 minutes. After the mixture was cooled to room temperature, the crystals precipitated were removed by filtration, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to one quarter volume. The residue was added with 300 ml of water and 300 ml of ethyl acetate, and insoluble precipitates were removed by filtration using celite. The filtrate was extracted with ethyl acetate (300 ml, 200 ml  $\times$  2), and the extract was washed with a saturated sodium hydrogen carbonate solution and saturated brine, and then dried over sodium sulfate and the solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (eluent: hexane:ethyl acetate=3:1 to 2:1). The crystal obtained was recrystallized from 50 ml of hexane to obtain Intermediate 15. 1.3 g (yield: 4%)

#### Synthesis of Compound 35

Compound 35 was synthesized from Intermediate 15 in a similar method to that for Intermediate 13 and Compound 33 (65 mg).

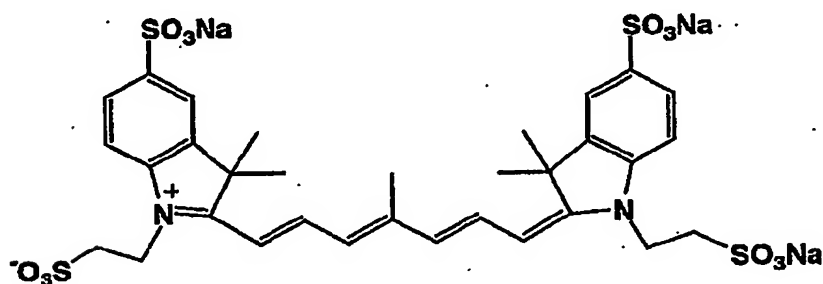
MS(FAB<sup>-</sup>, Glycerin) m/z = 842,804

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm) 1.70 (s, 12H), 1.90-2.00 (m, 8H), 2.90 (t, 4H, J=7.2Hz), 4.10 (t, 4H, J=7.2Hz), 6.22 (d, 2H, J=14.5Hz), 6.55 (dd, 2H, 14.5, 14.5Hz), 7.30-7.60 (m, 17H), 7.77 (dd, 2H, J=14.5, 14.5Hz)

#### Test Example 1 : Fluorescence imaging test

Tumor tissue pieces of mouse colon carcinoma (colon 26 carcinoma) were subcutaneously grafted to the left breast of BALB/c nude mice (5 weeks old, Clea Japan, Inc.). Ten days later when the tumor grew to a diameter of about 8 mm, the mice were subjected to the test. As a fluorescence excitation light source, a titanium sapphire laser was used. The test mice were uniformly exposed to the laser light using a ring type light guide (Sumita Optical Glass Co.) wherein dispersion of irradiation was

within 10%. The irradiation power output was adjusted so that the power was about  $40 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  near skin surface of the mice. The fluorescence was excited at the maximum excitation wavelength of each compound and fluorescence emission from the mice was detected and photographed through a short wavelength cutoff filter (IR84, IR86, IR88, Fuji Photo Film CO., LTD.) with CCD camera (C4880, Hamamatsu Photonics K.K.). The cutoff filter was selected to fit the excitation wavelength of the compound. The exposure time was adjusted depending on the fluorescence intensity of each compound. Compound 2 as a test compound (0.5 mg/ml) was dissolved in physiological saline or phosphate buffer (pH7.4) and administered to the mice via a tail vein at the dose of 5.0 mg/Kg. At a given time after the administration of the test compound, the mice were anesthetized with diethyl ether and fluorescent light images of the entire body of the mice was photographed. For comparison, each of ICG (5 mg/kg, i.v.) and the following compound (Compound A) was administered and imaging was carried out in the same manner as above. The results are shown in Figs. 1 to 3.

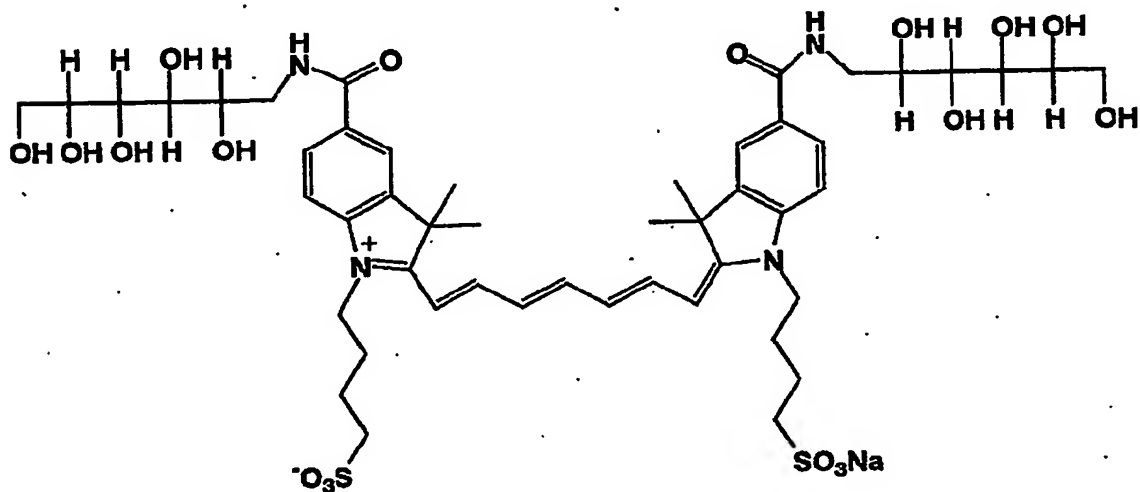


Compound 2 gave clear images of tumors at a shorter time after the administration as compared to the reference compounds. The position of tumor was not clear within 1 hour after the administration of the reference compounds. Whilst, Compound 2 successfully gave clear images of the tumor at 10 to 30 minutes after the administration and revealed to be highly effective as a fluorescent contrast agent (Fig. 1).

#### Test Example 2: Fluorescence imaging test

Tumor bearing mice were prepared in the same manner as Test Example 1, and conditions for irradiation was the same as those explained in Test Example 1.

Compound 5, Compound 7, and Compound 10 were used as test compounds. Each of the test compounds (0.5 mg/ml) was dissolved in physiological saline or phosphate buffer (pH 7.4) and administered to the mice via a tail vein at the dose of 5.0 mg/Kg. For comparison, the following compound (Compound B, 5 mg/kg, i.v.) was administered to the mice.



Light was generated using a tunable, pulsed, solid state laser system consisting of an optical parametric oscillator (OPO) pumped by the third harmonic of a Nd:Yag laser (Coherent Inc.). An excitation wavelength of  $\lambda_{ex} = 740 \text{ nm}$  was chosen and guided with an optical fiber to the tumor bearing nude mice. The dye-specific fluorescence exitance was imaged using a filter combination (Corion) and an intensified CCD camera (Roper Scientific.) at different times after dye administration (Fig. 4). Fluorescence imagings were taken before administration, and 1 min, 10 min, 30 min, 60 min, 2 hours, 4 hours, 24 hours after intravenous dye administration via the lateral tail venous at a standard dose of 5 mg/kg. In the first 60 min, the body temperature of the animals was kept at 38 °C with heating pad. Fluorescence imaging properties of the compounds were compared in nude mice tumor models. The results are shown in Figs. 5 to 8. Compound 5, Compound 7, and Compound 10 gave clear images of tumors at a shorter time after the administration as compared to the reference compound (Compound B). The position of tumor was not clear within 1 hour after the administration of the reference compound (Fig. 8). Whilst, the compounds of the present invention successfully gave clear images of the tumor at 10 to 30 minutes

after the administration (Figs. 5 to 7) and revealed to be highly effective as a fluorescent contrast agent

#### Effect of the Invention

The near infrared fluorescence contrast agent of the present invention can emit near infrared fluorescence by an excitation light. The near infrared fluorescence is superior in permeability through biological tissues, and therefore, the agent enables the detection of a lesion in a deep part of a living body.

#### Brief Explanation of Drawings

Fig. 1 is a photograph showing the results of fluorescence imaging at given times after the administration of Compound 2 of the present invention.

Fig. 2 is a photograph showing the results of fluorescence imaging at given times after the administration of ICG as a reference.

Fig. 3 is a photograph showing the results of fluorescence imaging at given times after the administration of Compound A as a reference.

Fig. 4 is a schematic view of experimental set up for fluorescence imaging in Test Example 2. In the figure, SHG represents second harmonic generation; THG represents third harmonic generation; and OPO represents optical parametric oscillator.

Fig. 5 is a photograph showing the results of fluorescence imaging at given times after the administration of Compound 5 of the present invention.

Fig. 6 is a photograph showing the results of fluorescence imaging at given times after the administration of Compound 7 of the present invention.

Fig. 7 is a photograph showing the results of fluorescence imaging at given times after the administration of Compound 10 of the present invention.

Fig. 8 is a photograph showing the results of fluorescence imaging at given times after the administration of Compound B as a reference.

【書類名】

外国語図面

Fig.1

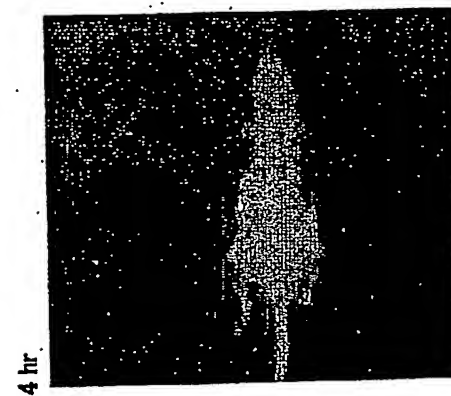
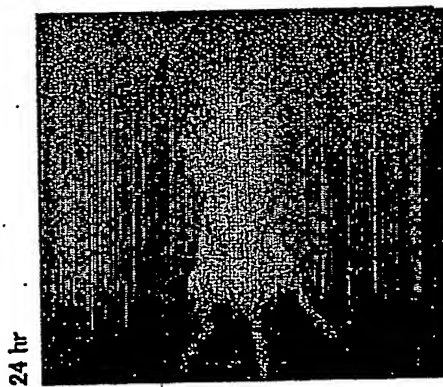
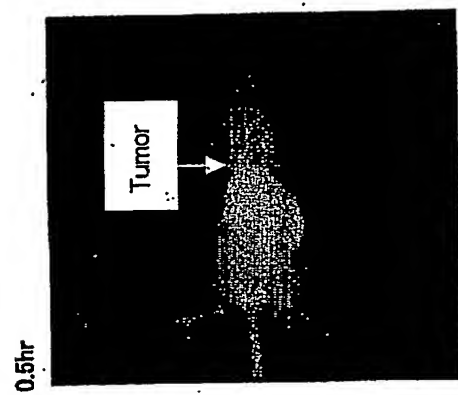


Fig.2

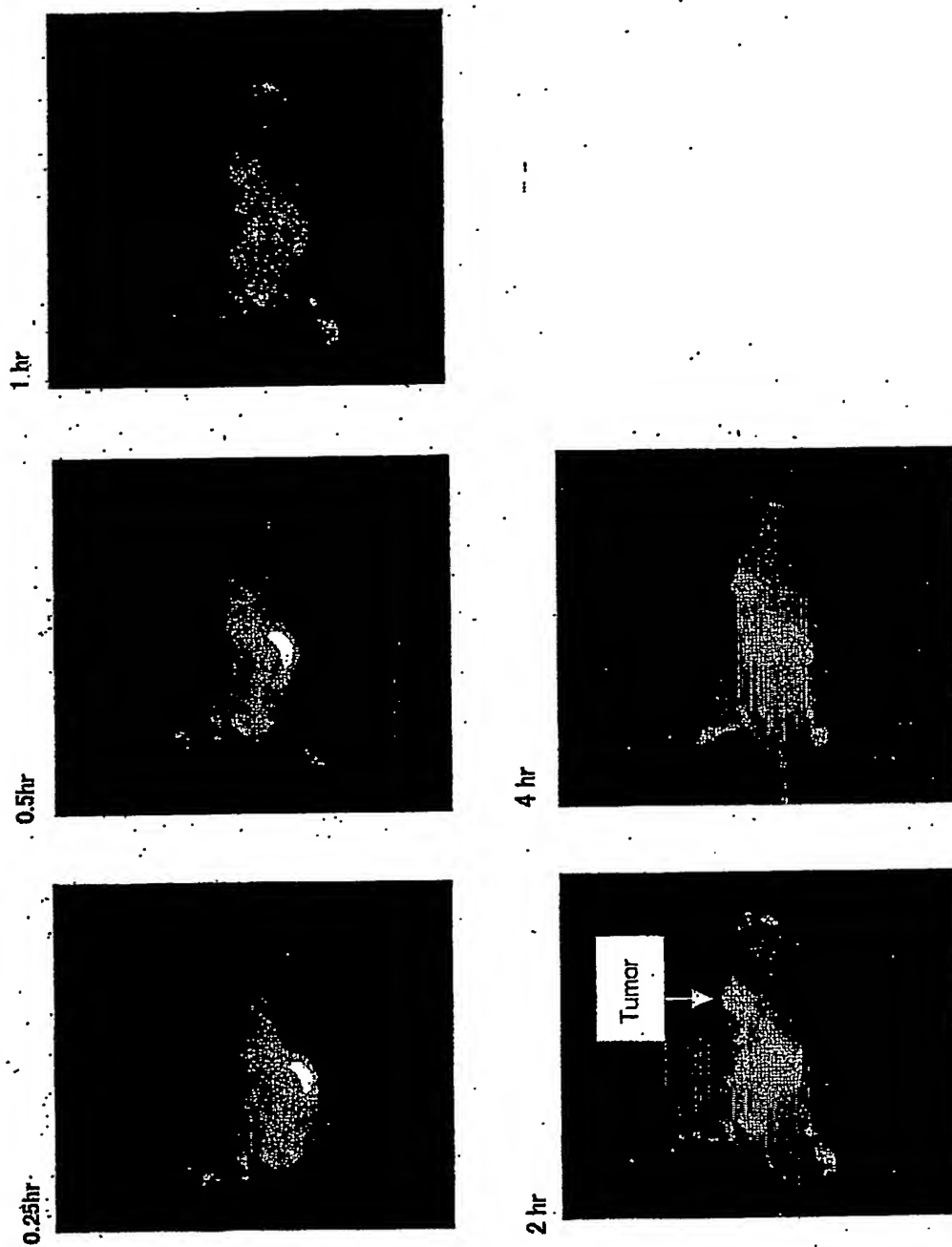
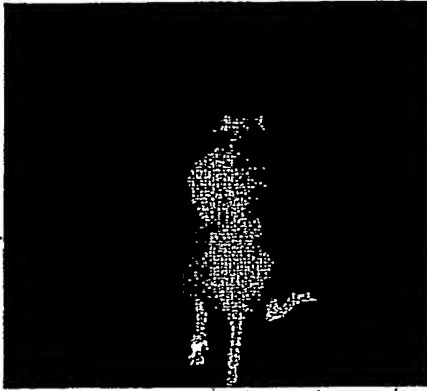
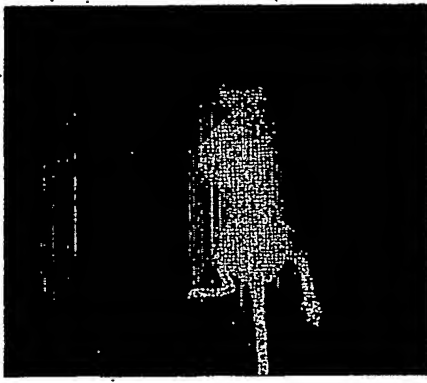


Fig.3

2 hr



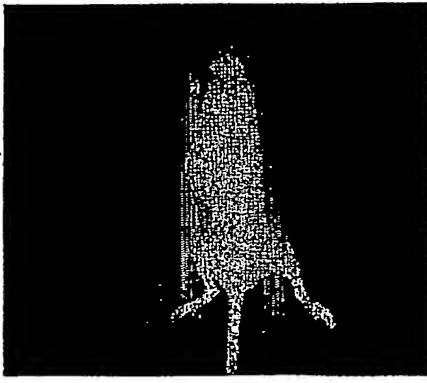
1 hr



24 hr



0.5 hr



4 hr





Fig.4

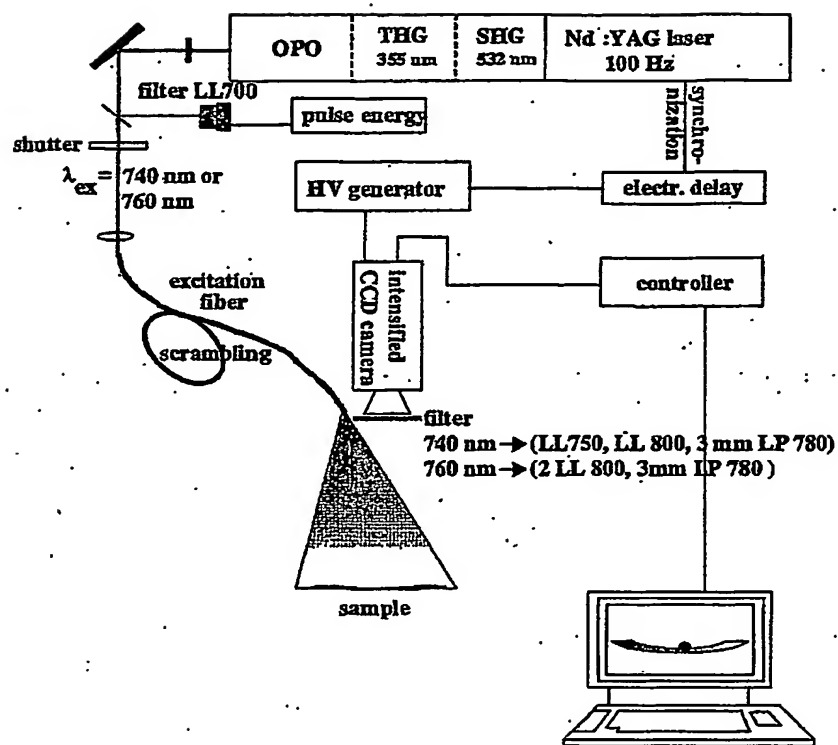


Fig.5

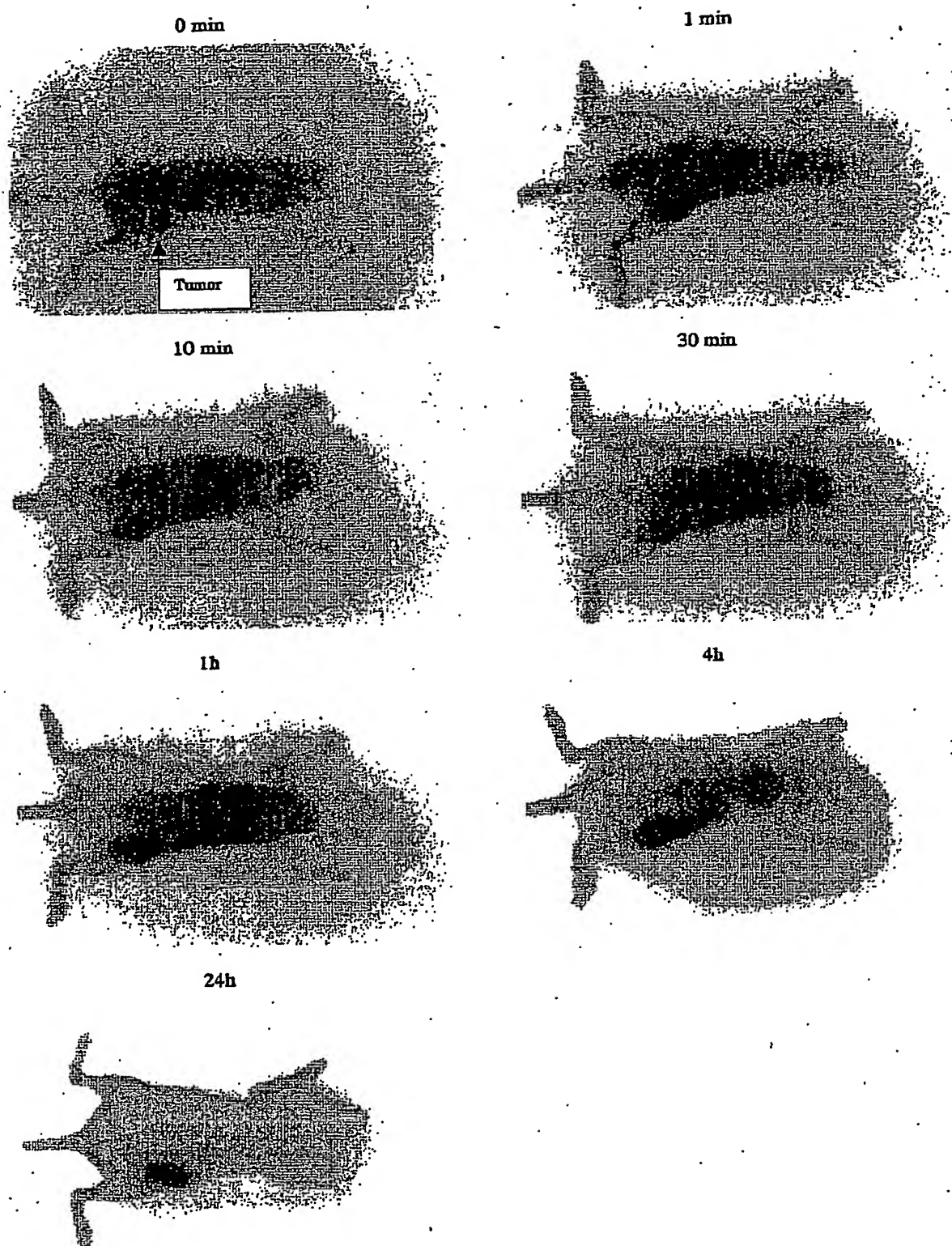
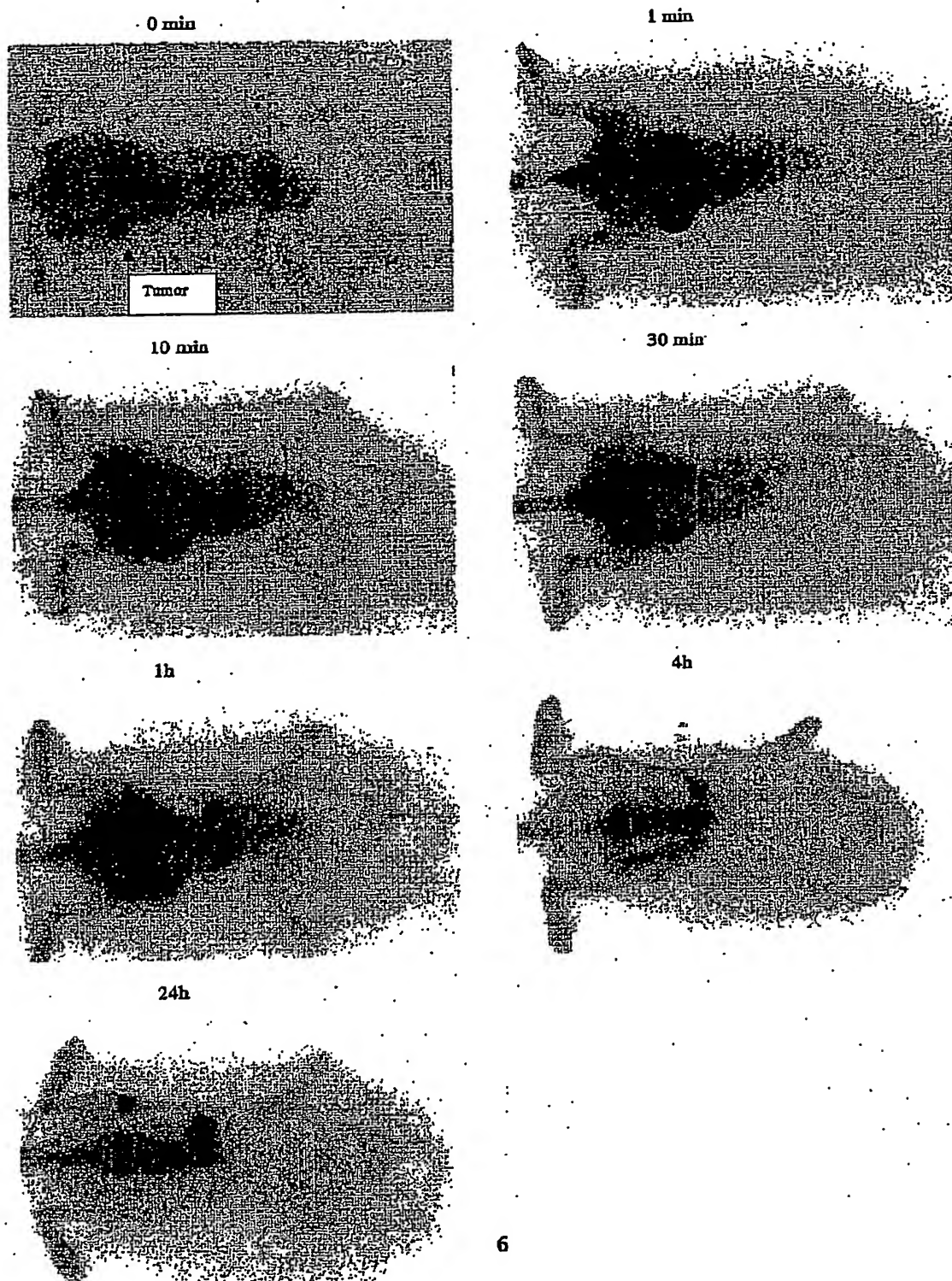


Fig.6



6

Fig.7

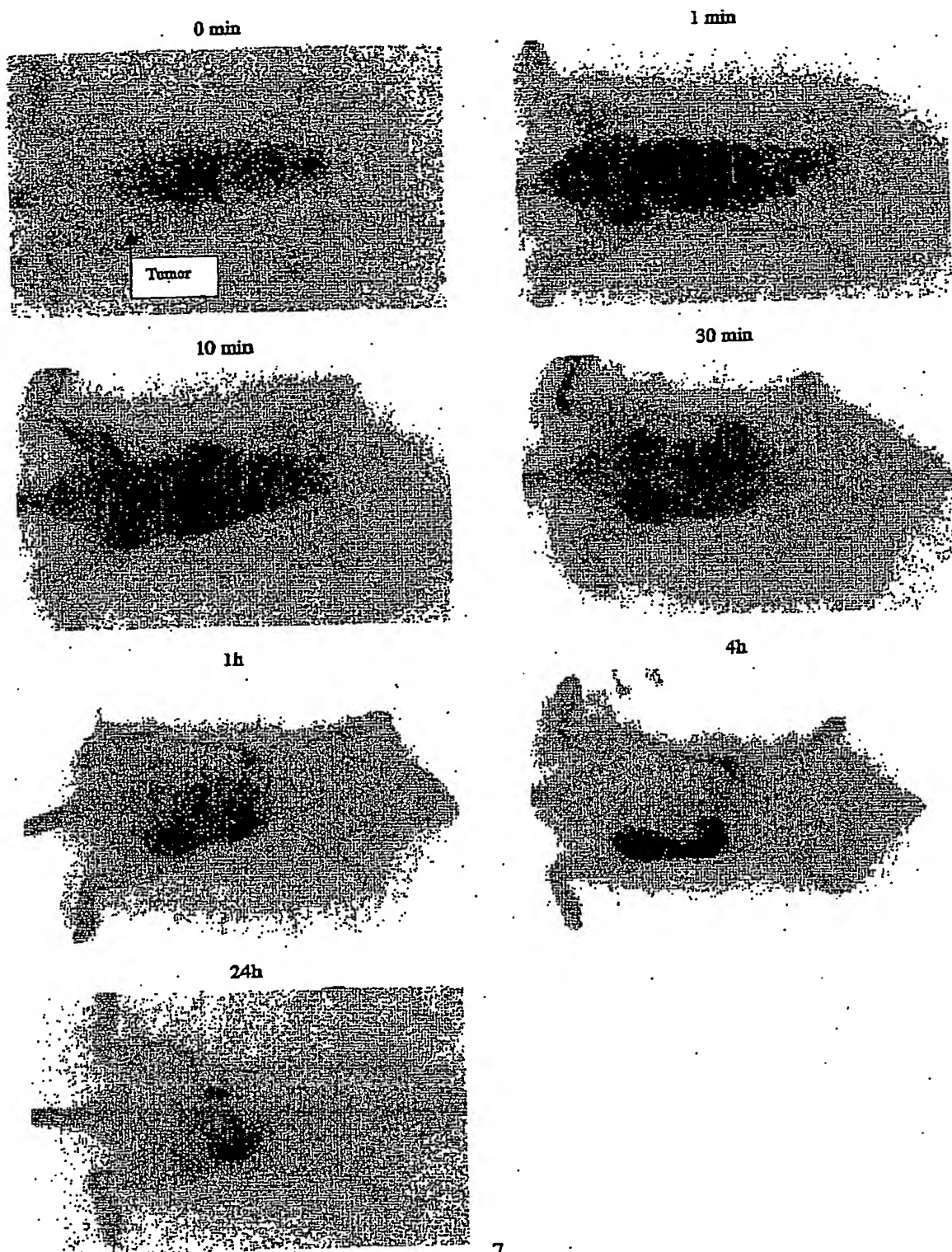
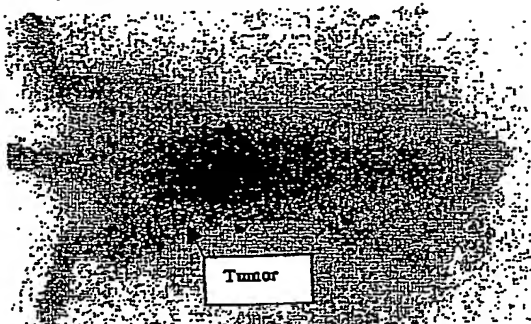


Fig.8

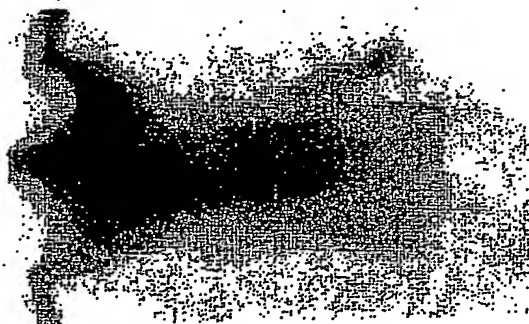
No.:8, mouse 17, 0 min., File 10SLi7



No.:8, mouse 17, 1 min., File 10SLi12



No.:8, mouse 17, 10 min., File 10SLi17



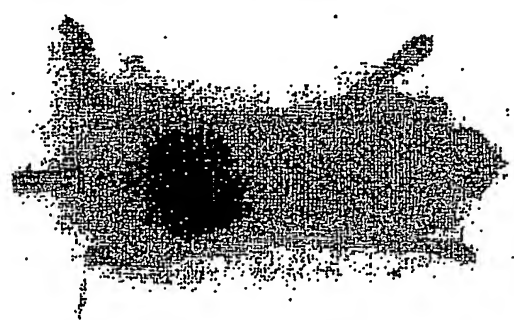
No.:8, mouse 17, 30 min., File 10SLi30



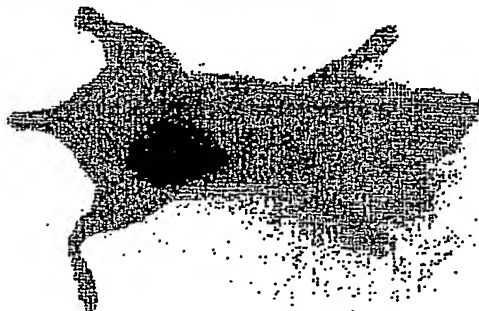
No.:8, mouse 17, 1h, File 10SLi43



No.:8, mouse 17, 4h, File 10SLi53



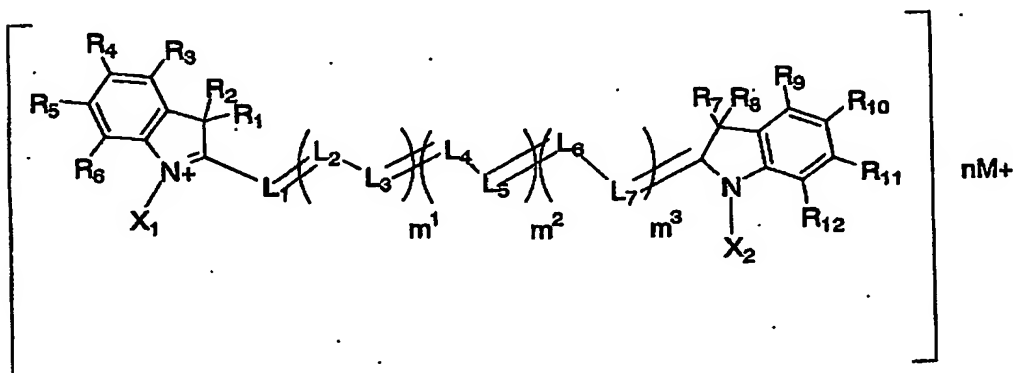
No.:8, mouse 17, 24h, File 11SLi2



【書類名】 外国語要約書

## 1. ABSTRACT

A near infrared fluorescent contrast agent which is excellent in permeability in a living tissue and enables specific imaging of tumor and/or blood vessel, comprising a compound represented by the following formula [I] or a pharmaceutically acceptable salt thereof:



wherein  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^7$ , and  $R^8$  represent a  $C_1$ - $C_{10}$  alkyl group or the like;  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ , and  $R^{12}$  represent a hydrogen atom, a  $C_1$ - $C_8$  alkyl group, an aryl group or the like;  $X^1$  and  $X^2$  represent a  $C_1$ - $C_{15}$  alkyl group or an aryl group and  $X^1$  and  $X^2$  in total have 0 to 4 carboxyl groups;  $m^1$ ,  $m^2$ , and  $m^3$  represents 0 or 1;  $L^1$  to  $L^7$  independently represent a methine group;  $M$  represents a hydrogen atom, a metal, or a quaternary ammonium salt; and  $n$  represents an integer of 1 to 7 necessary for neutralizing charge.

## 2. Representative Drawing

None

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 1 0 9 7 9 4
受付番号	2 0 2 0 0 4 5 0 1 4 5
書類名	特許願
担当官	松野 邦昭 2 2 0 9
作成日	平成 1 4 年 5 月 1 3 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000005201
【住所又は居所】	神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地
【氏名又は名称】	富士写真フイルム株式会社

【特許出願人】

【識別番号】	300049958
【住所又は居所】	ドイツ連邦共和国 デー ー 1 3 3 5 3 ベルリン ミューラーシュトラッセ 1 7 8
【氏名又は名称】	シエーリング アクチエンゲゼルシャフト

【代理人】

【識別番号】	100096219
【住所又は居所】	東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 特許業務法人特許事務所サイクス
【氏名又は名称】	今村 正純

【代理人】

【識別番号】	100092635
【住所又は居所】	東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 特許業務法人特許事務所サイクス
【氏名又は名称】	塩澤 寿夫

【代理人】

【識別番号】	100095843
【住所又は居所】	東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 特許業務法人特許事務所サイクス
【氏名又は名称】	釜田 淳爾

次頁無



【書類名】 翻訳文提出書

【整理番号】 A11561M

【提出日】 平成14年 5月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【出願の表示】

【出願番号】 特願2002-109794

【特許出願人】

【識別番号】 000005201

【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 599131011

【氏名又は名称】 シェリング アクチェンゲゼルシャフト

【代理人】

【識別番号】 100096219

【弁理士】

【氏名又は名称】 今村 正純

【確認事項】

本書に添付した翻訳文は、特願2002-109794  
の正確な日本語への翻訳文であり、当該特許出願に記載  
されていない事項が本書に添付した翻訳文に記載されて  
いる場合には、当該出願が拒絶又は無効となる可能性が  
あると承知していることを申し述べる。

【提出物件の目録】

【物件名】 外国語明細書の翻訳文 1

【物件名】 外国語図面の翻訳文 1

【物件名】 外国語要約書の翻訳文 1

【ブルーフの要否】 要



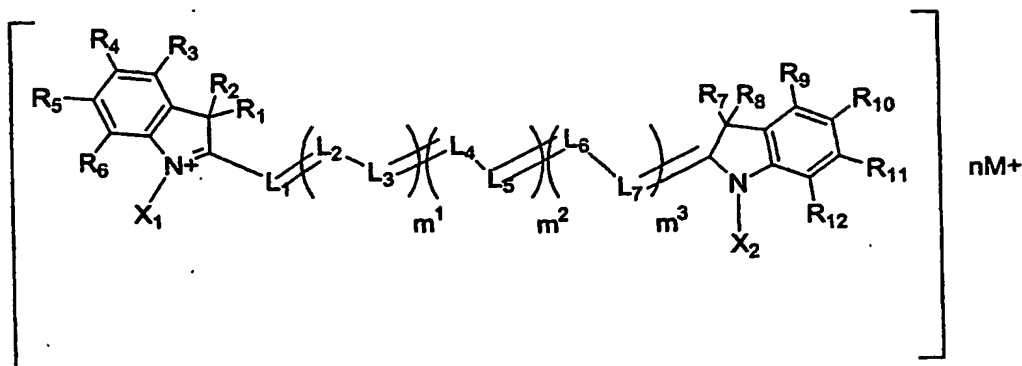
【書類名】 明細書

【発明の名称】 近赤外蛍光造影剤および蛍光造影法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の一般式（I）：

【化1】



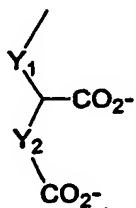
（式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^7$ 、及び $R^8$ はそれぞれ独立して置換若しくは無置換の炭素数1～10のアルキル基又は置換若しくは無置換のアリール基を示し、 $R^1$ 及び $R^2$ 及び／又は $R^7$ 及び $R^8$ は互いに結合して環を形成してもよく； $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、及び $R^{12}$ はそれぞれ独立して水素原子、置換若しくは無置換の炭素数1～6のアルキル基、置換若しくは無置換のアリール基、置換若しくは無置換のヘテロアリール基、ハロゲン原子、シアノ基、カルボキシル基、又はスルホ基を示し、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、及び $R^{12}$ は互いに結合して環を形成してもよく； $X^1$ 及び $X^2$ はそれぞれ独立して置換若しくは無置換の炭素数1～15のアルキル基または置換若しくは無置換のアリール基を示し、 $X^1$ 及び $X^2$ は全部で0から4個のカルボキシル基を有し、カルボキシル基の数が0または1個の場合は $X^1$ 及び $X^2$ のそれぞれが炭素数1～5のカルボキシアルキル基またはスルホアルキル基であり、且つ $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、及び $R^{12}$ の少なくとも1つは置換若しくは無置換のアリール基又は置換若しくは無置換のヘテロアリール基を示し、 $m^1$ は0又は1を示し； $m^2$ は0又は1を示し； $m^3$ は0又は1を示し； $L^1$ 、 $L^2$ 、 $L^3$ 、 $L^4$ 、 $L^5$ 、 $L^6$ 、及び $L^7$ はそれぞれ独立して置換又は無置換のメチン基を示し、該メチン基のうち2以上のメチン基が置換基を有する場合には、該置換基は互い結合して環を形成してもよく、 $X^1$ 及び $X^2$ のそれぞれが一つのカルボキシル基を有する場合は $X^1$ 及

び $X^2$ のそれぞれはカルボキシル基置換炭化水素基であり、且つ $L^1$ 、 $L^2$ 、 $L^3$ 、 $L^4$ 、 $L^5$ 、 $L^6$ 及び $L^7$ によって示される少なくとも一つのメチン基は置換メチン基であり、且つ $R^4$ 及び $R^{10}$ はスルホ基を示し；Mは水素原子、金属、又は第4級アンモニウム塩を示し；nは電荷を中和するために必要な1～7の整数を示す）  
で表される化合物又はその医薬上許容される塩を含む近赤外蛍光造影剤。

【請求項2】  $m^1$ 、 $m^2$ 及び $m^3$ のそれぞれが1である請求項1に記載の近赤外蛍光造影剤。

【請求項3】  $X^1$ が下記式（i）：

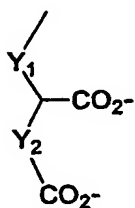
【化2】



（式中、 $Y^1$ 及び $Y^2$ はそれぞれ独立して置換又は無置換の二価の連結基を示す）  
で表される基である請求項1又は2に記載の近赤外蛍光造影剤。

【請求項4】  $X^1$ 及び $X^2$ がそれぞれ独立して下記式（i）：

【化3】



（式中、 $Y^1$ 及び $Y^2$ はそれぞれ独立して置換又は無置換の二価の連結基を示す）  
で表される基である請求項1又は2に記載の近赤外蛍光造影剤。

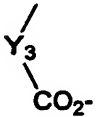
【請求項5】  $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、及び $R^{12}$ の少なくとも1つは置換若しくは無置換のアリール基又は置換若しくは無置換のヘテロアリール基である請求項1から4のいずれか1項に記載の近赤外蛍光造影剤。

【請求項6】  $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^{10}$ 、及び $R^{11}$ の少なくとも1つは置換若しくは無置換のアリール基又は置換若しくは無置換のヘテロアリール基であり； $X^1$ 及び $X^2$ のそれぞれが独立して炭素数1～5のカルボキシアリール基又はスルホアリール基で

ある請求項1又は2に記載の近赤外蛍光造影剤。

【請求項7】  $X^1$ 及び $X^2$ がそれぞれ独立して下記式：

【化4】



(式中、 $Y^3$ は炭素数1～10の炭化水素基を示し、 $L^1$ 、 $L^2$ 、 $L^3$ 、 $L^4$ 、 $L^5$ 、 $L^6$ 、及び $L^7$ の少なくとも一つは置換メチン基であり、 $R^4$ 及び $R^{10}$ のそれぞれはスルホ基を示す)

で表される基である請求項1又は2に記載の近赤外蛍光造影剤。

【請求項8】  $Y^1$ が $-(CH_2)_pCONH-$ （ここでpは1から4の整数を示す）を表し、 $Y^2$ が、 $-(CH_2)-$ 又は $-(CH_2)_2-$ を表す請求項1～4のいずれか1項に記載の近赤外蛍光造影剤。

【請求項9】 腫瘍造影に用いられる請求項1～8のいずれか1項に記載の近赤外蛍光造影剤。

【請求項10】 血管造影に用いられる請求項1～8のいずれか1項に記載の近赤外蛍光造影剤。

【請求項11】 請求項1～8のいずれか1項に記載の近赤外蛍光造影剤を生体内に導入し、該生体に励起光を照射し、そして該造影剤からの近赤外蛍光を検出する工程を含む蛍光造影法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、近赤外蛍光造影剤ならびに該造影剤を用いる蛍光造影法に関する。

【0002】

【従来の技術】

疾患の治療において、生体内の疾患によって引き起こされる形態学的及び機能的変化をその疾患の早期段階で検出することは重要である。特に癌の治療のためには、腫瘍の位置や大きさを予め知ることは将来の治療のための戦略やプロトコ

ルを決定するための極めて重要な手段となる。これまで用いられている方法には穿刺等による生検の他、X線造影、MRI、超音波造影などの画像診断が挙げられる。生検は確定診断としては有効であるが、被験者への負担が大きく、また病変の経時的変化の追跡には適さない。また、X線造影やMRIは必然的に被験者に放射線や電磁波への被曝を起こす。さらに、上述したような従来の画像診断は、測定と診断に複雑な操作と長い時間を要する。大型な装置を外科手術中にこれらの方法に用いることもまた困難である。

## 【0003】

報告される画像診断法の一つには蛍光造影法が挙げられる(Lipson, R.L.ら, J. Natl. Cancer Inst., 26, 1-11 (1961))。この方法は特定の波長の励起光への暴露により蛍光を発する物質を造影剤として用いる。本方法は、生体外から励起光を照射し、生体内の蛍光造影剤から発せられる蛍光を検出する工程を含む。

## 【0004】

このような蛍光造影剤の一例としては、例えば腫瘍内に蓄積し、光化学治療(photodynamic therapy, PDT)に用いられているヘマトポルフィリン等のポルフィリン系化合物が挙げられる。他の例としては、フォトフィリンやベンゾポルフィリンが挙げられる(Lipson, R.L.ら, 上述, Meng, T.S.ら, SPIE, 1641, 90-98, (1992), W084/04665などを参照)。しかしながら、これらの化合物は本来PDTにおいて使用されるものであるため、光毒性(PDTには該特性が要求される)を有し、従ってこれらの化合物は診断剤として好ましくない。

## 【0005】

また、フルオレセイン、フルオレスカミンおよびリボフラビン等の既知の蛍光色素を用いる網膜循環系マイクロ血管造影法が知られている(米国特許4945239号)。しかしながら、これらの蛍光色素は生体組織に低い透過性しか達成できない400~600nmという可視光領域に蛍光を発するものであり、その結果生体内のより深層部の病変を検出することはほとんど困難である。

## 【0006】

また、肝機能や心拍出量を測定するために用いられるインドシアニンググリーン(以下、ICGと略す)を含むシアニン系化合物もまた蛍光造影剤として使用され

ることが報告されている (Haglund, M.M.ら, Neurosurgery, 35, 930 (1994), Li, X.ら, SPIE, 2389, 789-797 (1995))。シアニン系化合物は近赤外光領域(700~1300nm)で吸収を示す。

## 【0007】

近赤外光は生体組織に対して高い透過性を有し、10cm程度の頭蓋をも透過することが可能であることから最近臨床医学の分野で注目を集めているものである。例えば、光CT技術(媒質の光透過性を用いるCT技術)は、近赤外光が生体を透過でき、かつ生体内の酸素濃度や循環をこの領域内の光を用いて検出することができることから臨床分野における新しい技術として注目されるようになってきた。

## 【0008】

シアニン系化合物は、上述したように優れた生体組織透過性を有する近赤外領域に蛍光を発するゆえ蛍光造影剤としての利用が提案されている。近年、種々のシアニン系化合物が開発され、蛍光造影剤として使用することのアプローチがなされている(W096/17628, W097/13490等)。しかしながら病変部位を正常組織とを区別するのに十分な性能を有する薬剤、即ち造影される標的部位への十分な選択性を有する薬剤はいまだ得られていない。

## 【0009】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、生体組織透過性に優れた近赤外領域に蛍光を発し、腫瘍及び／又は血管を特異的に造影することが可能な蛍光造影剤を提供することを目的とする。本発明の別の目的は、該近赤外蛍光造影剤を用いることによる蛍光造影法を提供することである。

## 【0010】

## 【課題を解決するための手段】

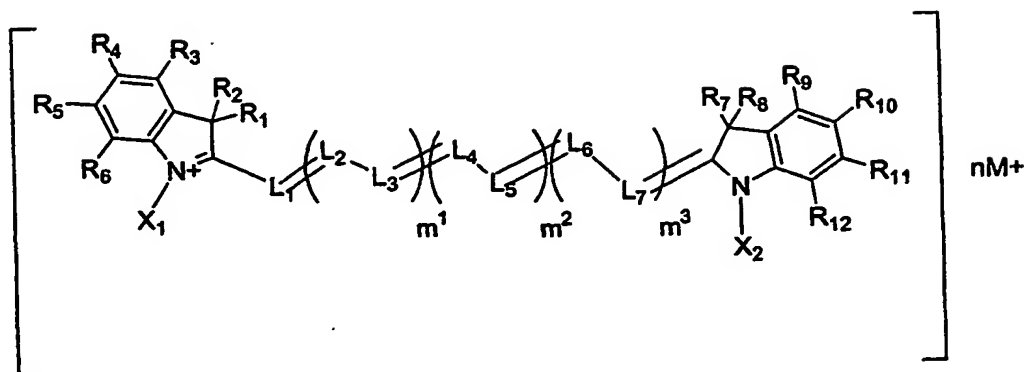
本発明者らは上記課題を達成すべく種々の鋭意研究を重ねた。その結果、カルボキシル基又はアリール基をシアニン色素に導入することにより、高い腫瘍選択性を有する蛍光造影剤を得ることに成功した。本発明者らはまた該造影剤を用いることによる蛍光造影法を確立して本発明を完成するに至った。本発明は上記の知見に基づいて完成されたものである。

【0011】

すなわち、本発明は下記の一般式（I）：

【0012】

【化5】



【0013】

（式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^7$ 、及び $R^8$ はそれぞれ独立して置換若しくは無置換の炭素数1～10のアルキル基又は置換若しくは無置換のアリール基を示し、 $R^1$ 及び $R^2$ 及び／又は $R^7$ 及び $R^8$ は互いに結合して環を形成してもよく； $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、及び $R^{12}$ はそれぞれ独立して水素原子、置換若しくは無置換の炭素数1～6のアルキル基、置換若しくは無置換のアリール基、置換若しくは無置換のヘテロアリール基、ハロゲン原子、シアノ基、カルボキシ基、又はスルホ基を示し、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、及び $R^{12}$ は互いに結合して環を形成してもよく； $X^1$ 及び $X^2$ はそれぞれ独立して置換若しくは無置換の炭素数1～15のアルキル基または置換若しくは無置換のアリール基を示し、 $X^1$ 及び $X^2$ は全部で0から4個のカルボキシ基を有し、カルボキシ基の数が0または1個の場合は $X^1$ 及び $X^2$ のそれぞれが炭素数1～5のカルボキシアルキル基またはスルホアルキル基であり、且つ $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、及び $R^{12}$ の少なくとも1つは置換若しくは無置換のアリール基又は置換若しくは無置換のヘテロアリール基を示し、； $m^1$ は0又は1を示し； $m^2$ は0又は1を示し； $m^3$ は0又は1を示し； $L^1$ 、 $L^2$ 、 $L^3$ 、 $L^4$ 、 $L^5$ 、 $L^6$ 、及び $L^7$ はそれぞれ独立して置換又は無置換のメチン基を示し、該メチン基のうち2以上のメチン基が置換基を有する場合には、該置換基は互いに結合して環を形成してもよく、 $X^1$ 及び $X^2$ のそれぞれが一つのカルボキシ基を有する場合は $X^1$

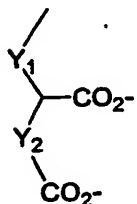
及び $X^2$ のそれぞれはカルボキシル基置換炭化水素基であり、且つ $L^1$ 、 $L^2$ 、 $L^3$ 、 $L^4$ 、 $L^5$ 、 $L^6$ 及び $L^7$ によって示される少なくとも一つのメチン基は置換メチン基であり、且つ $R^4$ 及び $R^{10}$ はスルホ基を示し； $M$ は水素原子、金属、又は第4級アンモニウム塩を示し； $n$ は電荷を中和するために必要な1～7の整数を示す）で表される化合物又はその医薬上許容される塩を含む近赤外蛍光造影剤を提供する。

【0014】

本発明の好ましい態様によれば、 $m^1$ 、 $m^2$ 、及び $m^3$ のそれぞれが同時に1であり、さらに $X^1$ が下記式（i）：

【0015】

【化6】



【0016】

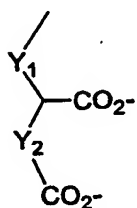
（式中、 $Y^1$ 及び $Y^2$ はそれぞれ独立して置換又は無置換の二価の連結基を示す）で表される基である。

【0017】

本発明のより好ましい態様によれば、 $X^1$ が及び $X^2$ がそれぞれ独立して下記式（i）：

【0018】

【化7】



【0019】

（式中、 $Y^1$ 及び $Y^2$ はそれぞれ独立して置換又は無置換の二価の連結基を示す）

で表される基である。

## 【0020】

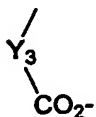
本発明のさらに好ましい態様によれば、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、及び $R^{12}$ の少なくとも1つは置換若しくは無置換のアリール基又は置換若しくは無置換のヘテロアリール基であり、そして本発明のさらに好ましい態様によれば、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^{10}$ 、及び $R^{11}$ の少なくとも1つは置換若しくは無置換のアリール基又は置換若しくは無置換のヘテロアリール基であり； $X^1$ 及び $X^2$ のそれぞれが炭素数1～5のカルボキシアルキル基又はスルホアルキル基である。

## 【0021】

本発明の別の好ましい態様によれば、 $X^1$ 及び $X^2$ がそれぞれ独立して下記式：

## 【0022】

【化8】



## 【0023】

(式中、 $Y^3$ は炭素数1～10の炭化水素基を示し、 $L^1$ 、 $L^2$ 、 $L^3$ 、 $L^4$ 、 $L^5$ 、 $L^6$ 、及び $L^7$ によって示される少なくとも一つは置換メチン基であり、 $R^4$ 及び $R^{10}$ のそれぞれはスルホ基を示す) で表される基である。

## 【0024】

好ましくは、分子内のスルホ基の数は2以下である。

さらに好ましい態様によれば、 $Y^1$ は $-(CH_2)_pCONH-$  (ここで  $p$  は1から4の整数を示す) を表し、 $Y^2$ は、 $-(CH_2)-$  又は  $-(CH_2)_2-$  を表す。

## 【0025】

上記の近赤外蛍光造影剤は好ましくは腫瘍造影又は血管造影に用いられる。

## 【0026】

別の局面から、上記の近赤外蛍光造影剤を生体内に導入し、該生体に励起光を照射し、そして該造影剤からの近赤外蛍光を検出する工程を含む蛍光造影法が提供される。



## 【0027】

## 【発明の実施の形態】

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^7$ 及び $R^8$ によって示される炭素数1～10のアルキル基は、直鎖状、分枝鎖状、環状、又はそれらの組み合わせのいずれでもよい(特に言及しない場合には、本明細書においてアルキル基又はアルキル部分を含む官能基のアルキル部分も同じ意味を有する。)。無置換のアルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ヘキシル基を用いることができる。置換アルキル基上に存在する置換基の個数、種類、位置は特に限定されない。置換アルキル基としては、例えば、スルホアルキル基、カルボキシルアルキル基、ヒドロキシルアルキル基、アルコキシルアルキル基、アミノアルキル基、ハロゲン化アルキル基、シアノアルキル基、アリール置換アルキル基、ヘテロアリール置換アルキル基等を用いることができる。

## 【0028】

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^7$ 及び $R^8$ によって示されるアリール基は単環又は縮合環のいずれでもよく、例えば6～14員のアリール基、好ましくは6～10員のアリール基を用いることができる(特に言及しない場合には、本明細書中においてアリール基又はアリール部分を含む官能基のアリール部分も同じ意味を有する。)。アリール基として、好ましくはフェニル基又はナフチル基、より好ましくはフェニル基を用いることができる。置換アリール基としては、スルホフェニル基、ヒドロキシフェニル基、アミノフェニル基を用いることができる。

## 【0029】

さらに、 $R^1$ と $R^2$ 、及び $R^7$ と $R^8$ は互いに結合して環を形成してもよい。形成される環としては、例えばシクロペンチル環、シクロヘキシル環等が挙げられる。 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^7$ 、及び $R^8$ は好ましくはメチル基又はエチル基であり、より好ましくはメチル基である。

## 【0030】

$R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 及び $R^{12}$ はそれぞれ独立して水素原子、置換若しくは無置換の炭素数1～6のアルキル基、置換若しくは無置換のアリール基、置換若しくは無置換のヘテロアリール基、ハロゲン原子、シアノ基、カルボキシル

基、又はスルホ基を示し、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、及び $R^6$ 、又は $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、及び $R^{12}$ からなる群から選ばれる隣接する2個の基は互いに独立して結合し、環を形成していてもよい。形成される環は飽和又は不飽和のいずれでもよく、炭化水素環又はヘテロ環のいずれであってもよい。例えば、 $R^3$ と $R^4$ 、 $R^4$ と $R^5$ 、 $R^5$ と $R^6$ 、 $R^9$ と $R^{10}$ 、 $R^{10}$ と $R^{11}$ 、又は $R^{11}$ と $R^{12}$ がそれぞれ結合して、ベンゼン環又はピリジン環などの芳香族ヘテロ環を形成することができる。これらの好ましい例として $R^3$ と $R^4$ 、 $R^9$ と $R^{10}$ の結合によって形成されるベンゼン環が挙げられる。

## 【0031】

$R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 及び $R^{12}$ によって示されるアリール基としては、例えばフェニル基又はナフチル基を用いることができ、ヘテロアリール基としては、例えばチエニル基、ベンゾチエニル基、フリル基、ベンゾフリル基、ピロリル基、イミダゾリル基、又はキノリル基を用いることができる。アリール基及びヘテロアリール基上には、1～4個の任意の置換基が存在していてもよい。置換基の位置は限定されず、2個以上の置換基が存在する場合には、それらは同一でも異なってもよい。そのような置換基としては、例えば、水酸基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子から選ばれるハロゲン原子；メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基などの炭素数1～6のアルキル基；トリフルオロメチル基などの炭素数1～6のハロゲン化アルキル基；メトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、イソプロポキシ基、*n*-ブトキシ基、*sec*-ブトキシ基、*tert*-ブトキシ基などの炭素数1～6のアルコキシ基；メチレンジオキシ基やエチレンジオキシ基などの炭素数1～6のアルキレンジオキシ基；カルボキシル基；炭素数1～6のアルコキシカルボニル基；無置換アミノ基；メチルアミノ基、ジメチルアミノ基、エチルアミノ基などの炭素数1～6のアルキル置換アミノ基；スルホ基；又はシアノ基などを用いることができる。

## 【0032】

$X^1$ 及び $X^2$ はそれぞれ独立して置換若しくは無置換の炭素数1～15のアルキル基または換若しくは無置換のアリール基を示し、 $X^1$ 及び $X^2$ は $X^1$ 及び $X^2$ 合わせて1～4個のカルボキシル基を有する。 $X^1$ 及び $X^2$ によって示される無置換のアルキル基

としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、tert-ペンチル基、2-メチルプロピル基、又は1,1-ジメチルプロピル基を用いることができる。アルキル基は、直鎖状、分枝鎖状、環状、又はそれらの組み合わせのいずれでもよいが、直鎖状又は分枝鎖状のアルキル基が好ましい。

## 【0033】

$X^1$ 及び $X^2$ によって示される置換アルキル基としては、例えば、スルホアルキル基(例えば2-スルホエチル基、3-スルホプロピル基、3-メチル-3-スルホプロピル基、4-スルホブチル基等)、カルボキシアルキル基(例えば1-カルボキシメチル基、2-カルボキシエチル基、3-カルボキシプロピル基、4-カルボキシブチル基等)、ヒドロキシアルキル基、アルコキシアルキル基、アミノアルキル基、ハロゲン化アルキル基、シアノアルキル基、ヘテロアリール置換アルキル基、アリール基、又はヘテロアリール基を用いることができる。これらの基におけるアルキル部分は上記に定義した無置換アルキル基と同じである。 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^7$ 及び $R^8$ で示される置換又は無置換のアリール基としては、フェニル基、スルホフェニル基、ヒドロキシフェニル基、又はアミノフェニル基を用いることができる。

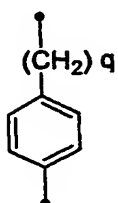
## 【0034】

$X^1$ 及び $X^2$ のカルボキシル基の数が0または1個の場合は $X^1$ 及び $X^2$ として炭素数1～5のカルボキシアルキル基またはスルホアルキル基を用いることができる。

## 【0035】

また $Y^1$ 及び $Y^2$ によって示される二価の連結基としては、例えば、メチレン基、エチレン基、n-ブチレン基、メチルプロピレン基などの置換又は無置換の炭素数1～6のアルキレン基、又はフェニレン基を用いることができる。他の例として、下記式：

【化 9】



【0036】

(式中、 $q$ は1から4の整数を表し、“ $\cdot$ ”印は結合部位を示す)

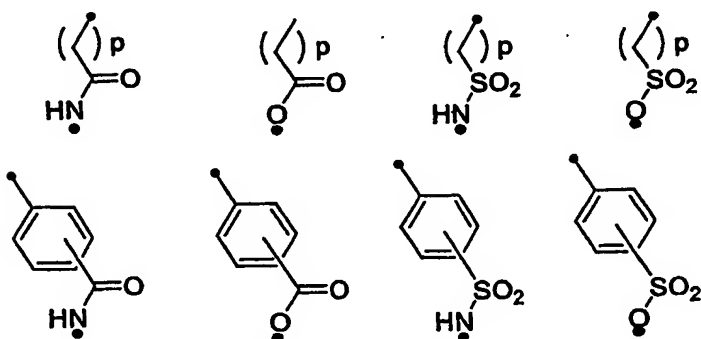
で表される連結基を用いることができる。これらの炭化水素基は置換基を有していてもよく、1個以上のヘテロ原子を含んでいてもよい。例えばエーテル結合、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、アミド結合、エステル結合、スルホアミド結合、又はスルホエステル結合を含んでいてもよい。

【0037】

また $Y^1$ 及び $Y^2$ によって示される二価の連結基として、例えば、下記式：

【0038】

【化10】



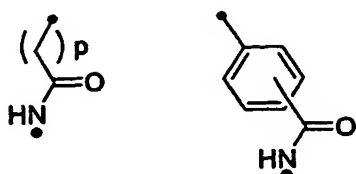
【0039】

(式中、 $q$ は1から4の整数を示し、“ $\cdot$ ”印は結合部位を示す)

で表される結合基を用いることができる。 $Y^1$ の好ましい例としては、下記式：

【0040】

## 【化 11】



## 【0041】

(式中、 $p$  は 1～4 の整数を示す) で表される連結基が挙げられる。最も好ましくは  $Y^1$  は  $-(\text{CH}_2)_p-\text{CO}-\text{NH}-$  (式中、 $p$  は 1～4 の整数を示す) である。 $Y^2$  の好ましい例はメチレン基又はエチレン基が挙げられる。

## 【0042】

$L^1$ 、 $L^2$ 、 $L^3$ 、 $L^4$ 、 $L^5$ 、 $L^6$  及び  $L^7$  はそれぞれ独立して置換又は無置換のメチン基を示し、 $m^1$ 、 $m^2$ 、及び  $m^3$  はそれぞれ独立して 0 又は 1 を示す。 $m^1$ 、 $m^2$ 、及び  $m^3$  のそれぞれは同時に 1 であることが好ましい。メチン基上の置換基としては、置換若しくは無置換のアルキル基、ハロゲン原子、置換若しくは無置換のアリール基、又は低級アルコキシ基等が挙げられる。置換アリール基の具体例としては、4-クロルフェニル基等が挙げられる。低級アルコキシ基は、好ましくは直鎖または分岐鎖状のいずれでも良い炭素数 1～6 のアルコキシ基である。具体例にはメトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基、tert-ブトキシ基、ペンチルオキシ基等が挙げられ、メトキシ基、エトキシ基が好ましい。メチン基の置換基としては、好ましくはメチル基又はフェニル基を用いることができる。

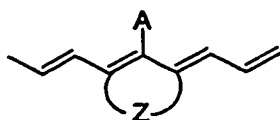
## 【0043】

また  $L^1$ 、 $L^2$ 、 $L^3$ 、 $L^4$ 、 $L^5$ 、 $L^6$  及び  $L^7$  から選ばれるメチン基が置換されている場合、メチン基上の置換基は互いに結合して環を形成してもよい。好ましくはメチン基上の置換基は  $L^1$ 、 $L^2$ 、 $L^3$ 、 $L^4$ 、 $L^5$ 、 $L^6$  及び  $L^7$  から成る群から選択される 3 つの連続するメチン基を含む環を形成してもよい。メチン基上の置換基が互いに結合して  $L^1$ 、 $L^2$ 、 $L^3$ 、 $L^4$ 、 $L^5$ 、 $L^6$  及び  $L^7$  から成る群から選択される 3 つの連続するメチン基を含む環を形成する例としては、例えば、4, 4-ジメチルシクロヘキサン環が  $L^3$ 、 $L^4$ 、及び  $L^5$  を含むように形成される化合物が挙げられる。 $L^1$ 、 $L^2$ 、 $L^3$ 、 $L^4$ 、 $L^5$ 、 $L^6$  及び  $L^7$  から選ばれるメチン基により形成される共役メチン鎖が環

を含む部分構造の特に好ましい例は、下記一般式 (a) :

【0044】

【化12】



【0045】

(式中、Zは5又は6員環を形成するために必要な非金属原子群を示し、Aは水素原子原子又は一価の基を示す)

で表される基が挙げられる。

【0046】

Zによって示される5～10員環を形成するために必要な非金属原子群の例としては、例えば、炭素原子、窒素原子、酸素原子、水素原子、硫黄原子、ハロゲン原子(フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子)等が挙げられる。一般式 (a) で表される部分構造中の5又は6員環の例としては、例えば、シクロペンテン環、シクロヘキセン環、及び4,4-ジメチルシクロヘキセン環等を挙げることができ、シクロペンテン環又はシクロヘキセン環が好ましい。

【0047】

Aによって示される一価の基としては、例えば置換若しくは無置換のアルキル基、置換若しくは無置換のアリール基、置換若しくは無置換のアラルキル基、置換若しくは無置換の低級アルコキシ基、置換若しくは無置換のアミノ基、置換若しくは無置換のアルキルカルボニルオキシ基(アセトキシ基など)、置換若しくは無置換のアルキルチオ基、置換若しくは無置換のアリールチオ基、シアノ基、ニトロ基、ハロゲン原子等が挙げられる。

【0048】

Aによって示されるアラルキル基の具体例としては、ベンジル基、2-フェニル

エチル基、3-フェニルプロピル基等が挙げられる。アラルキル基の置換基としては、例えば、スルホ基、カルボキシル基、水酸基、置換若しくは無置換のアラルキル基、アルコキシ基、ハロゲン原子等が挙げられる。Aによって示される置換アミノ基の具体例としては、例えばアルキルアミノ基(例えばメチルアミノ基、エチルアミノ基等)、ジアルキルアミノ基(例えばジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基等)、フェニルアミノ基、ジフェニルアミノ基、メチルフェニルアミノ基、環状アミノ基(例えばモルホリノ基、イミダゾリジノ基、エトキシカルボニルピペラジノ基等)が挙げられる。前記置換アミノ基がさらに置換基を有する場合には、置換基としてスルホ基又はカルボキシル基等を用いることができる。Aによって示されるアリルチオ基の具体例としては、フェニルチオ基、ナフチルチオ基等が挙げられ、アルキルチオ基の置換基としてはスルホ基、カルボキシル基等が挙げられる。

## 【0049】

Aによって示される一価の基として、フェニルアミノ基、ジフェニルアミノ基、エトキシカルボニルピペラジノ基、アリールチオ基等が挙げられる。

## 【0050】

Yは5～10員のヘテロ環、好ましくは5又は6員のヘテロ環を形成するのに必要な非金属原子を示す(該ヘテロ環は縮合環であってもよい)。Yによって形成される5～10員のヘテロ環としては次の環：チアゾール環(例えばチアゾール、4-メチルチアゾール等)、ベンゾチアゾール環(例えばベンゾチアゾール、4-クロロベンゾチアゾール等)、ナフトチアゾール環(例えばナフト[2,1-d]チアゾール、ナフト[1,2-d]チアゾール等)、チアゾリン環(例えばチアゾリン、4-メチルチアゾリン等)、オキサゾール環(例えばオキサゾール、4-ニトロオキサゾール等)、ベンゾオキサゾール環(例えばベンゾオキサゾール、4-クロロベンゾオキサゾール等)、ナフトオキサゾール環(例えばナフト[2,1-d]オキサゾール、ナフト[1,2-d]オキサゾール等)、セレナゾール環(例えばセレナゾール、4-フェニルセレナゾール等)、ベンゾセレナゾール環(例えばベンゾセレナゾール、4-クロロベンゾセレナゾール等)、ナフトセレナゾール環(例えばナフト[2,1-d]セレナゾール、ナフト[1,2-d]セレナゾール等)、3,3-ジアルキルインドレニン環(例えば3,3

ージニトロインドレニン、3,3-ジエチルインドレニン、3,3-ジメチル-5-ニトロインドレニン等)、イミダゾール環(例えば1-アルキルイミダゾール、1-アルキル-4-フェニルイミダゾール等)、ピリジン環(例えば2-ピリジン、5-メチル-2-ピリジン等)、キノリン環(例えば2-キノリン、3-メチル-2-キノリン等)、イミダゾ[4,5-b]キノキサリン環(例えば1,3-ジエチルイミダゾ[4,5-b]キノキサリン等)等が挙げられる。Yによって形成される5~10員のヘテロ環の好ましい例としては3,3-ジアルキルインドレニン環が挙げられる。

## 【0051】

Mは水素原子、金属、第4級アンモニウム塩、その他医薬上許容できる塩を表す。「医薬上許容しうる塩」とは一般式(I)で表される化合物と無毒性の塩を形成できるものであればいかなるものであってもよい。例えばナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩;マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩;アンモニウム塩、トリエチルアンモニウム塩、トリブチルアンモニウム塩、ピリジニウム塩等の有機アンモニウム塩;リジン塩、アルギニン塩等のアミノ酸塩等が挙げられる。特に好ましくは、生体に対して軽減された毒性を有するナトリウム塩である。

## 【0052】

本発明の化合物は、置換基の種類により、1個以上の不斉炭素を有する場合がある。また、硫黄原子が不斉中心として作用する場合もある。1個以上の不斉炭素に基づく光学的に純粋な形態の任意の光学異性体、上記の光学異性体の任意の混合物、ラセミ体、2個以上の不斉炭素に基づくジアステレオ異性体、上記のジアステレオ異性体の任意の混合物などは、いずれも本発明の範囲に包含される。

## 【0053】

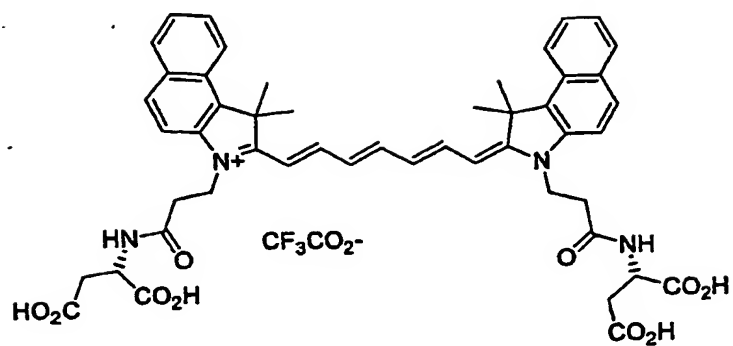
本発明の化合物の具体例を以下に示す。しかしながら、本発明は次の化合物に限定されることはない。

## 【0054】

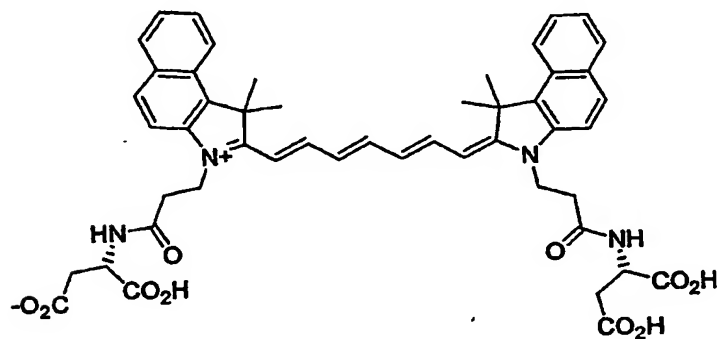


【化 13】

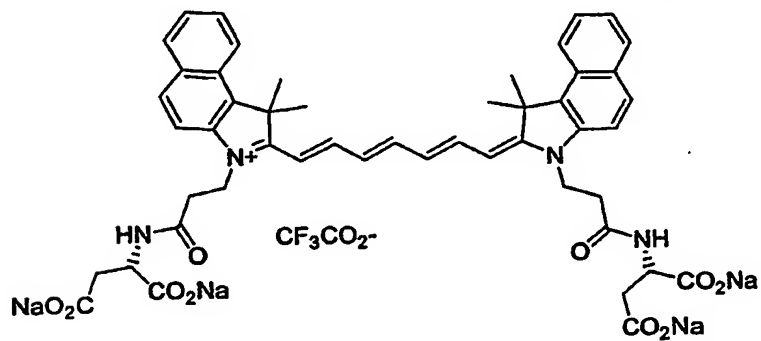
化合物 1



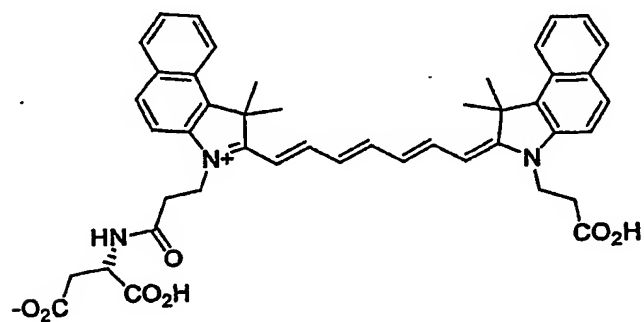
化合物 2



化合物 3



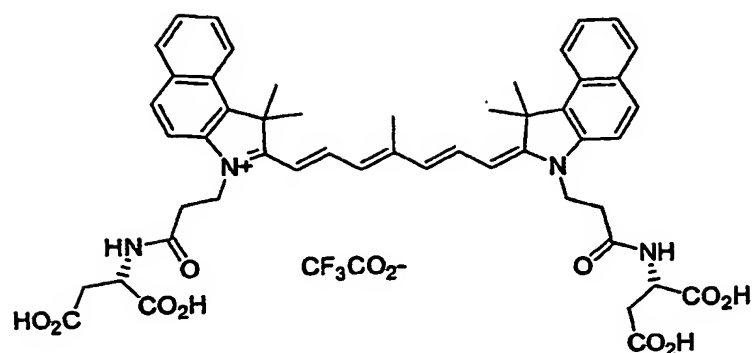
化合物 4



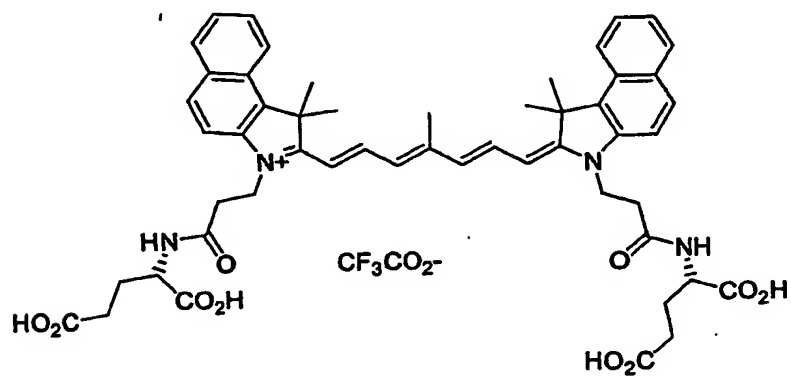
【0055】

【化 14】

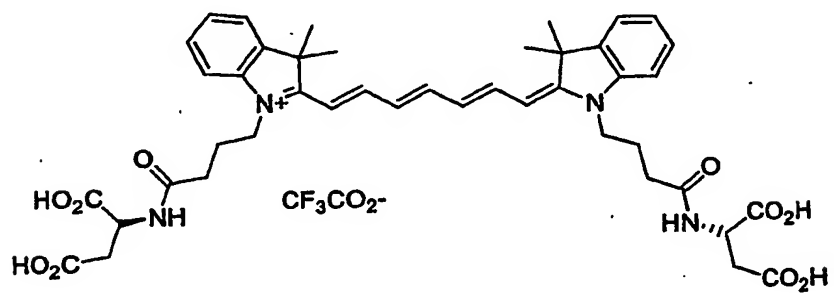
化合物 5



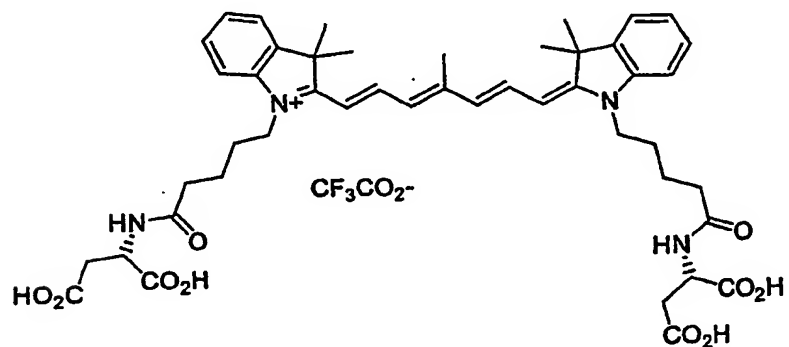
化合物 6



化合物 7



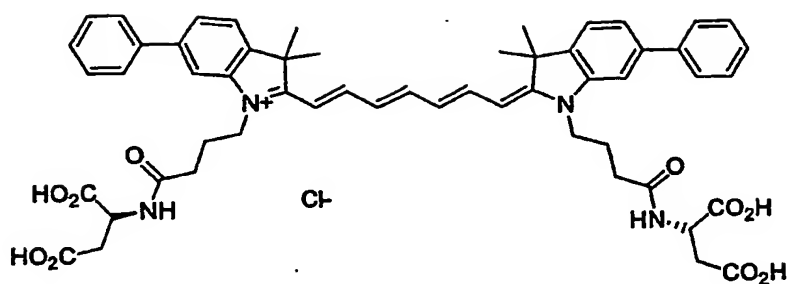
化合物 8



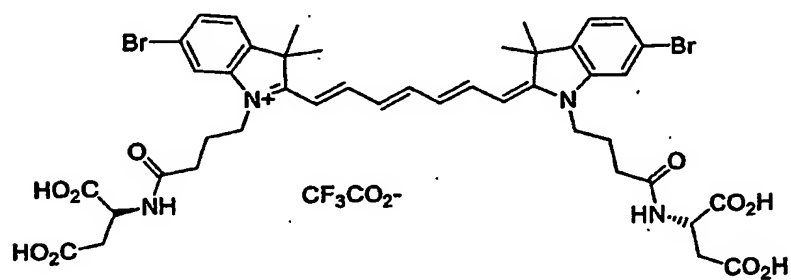
【0056】

【化15】

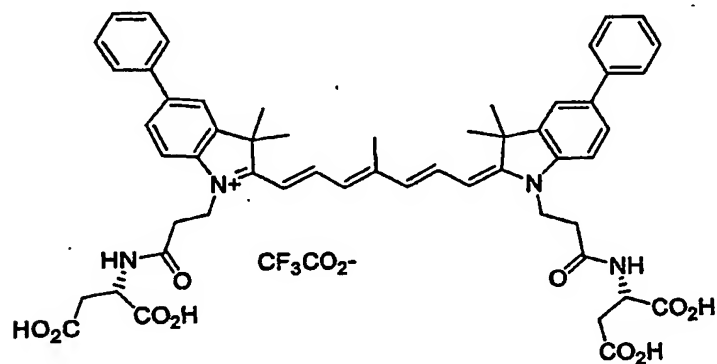
化合物9



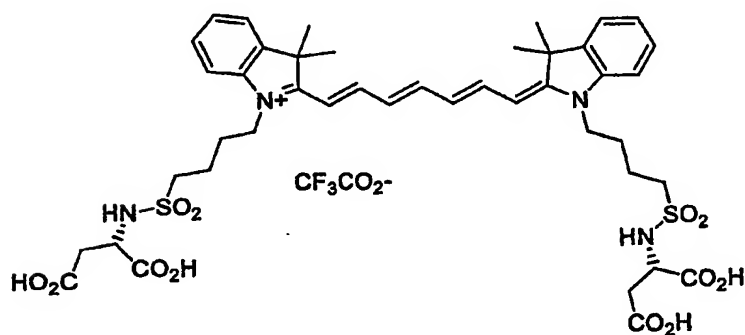
化合物10



化合物11



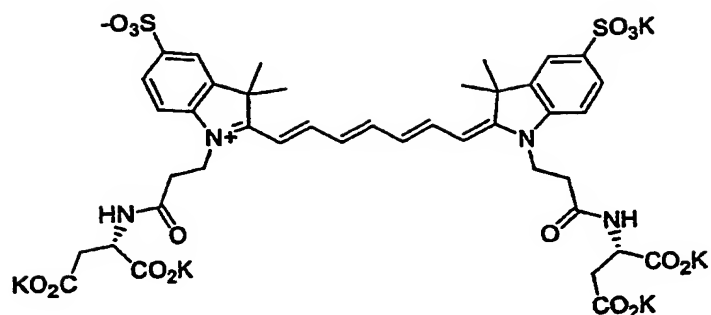
化合物12



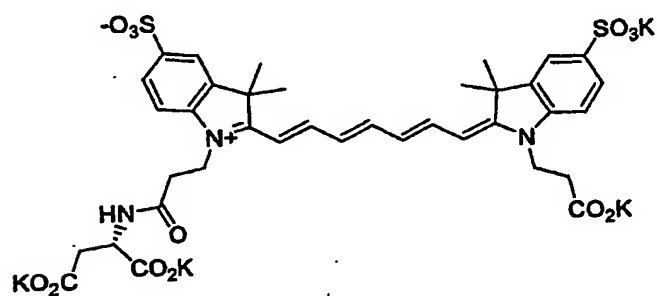
【0057】

【化 16】

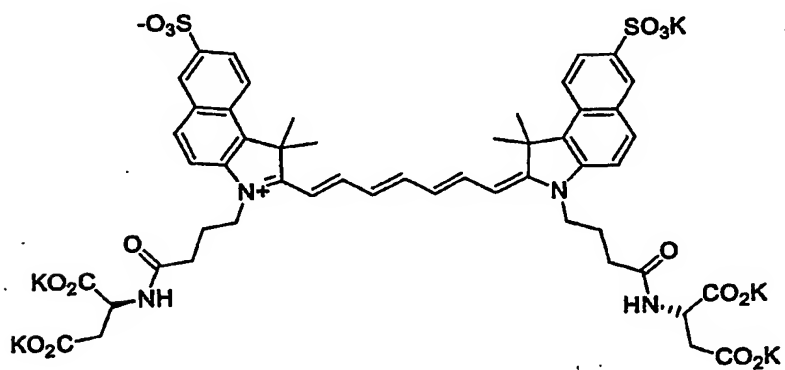
化合物 13



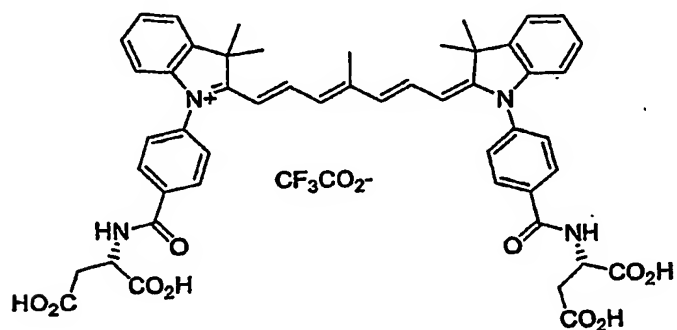
化合物 14



化合物 15



化合物 16

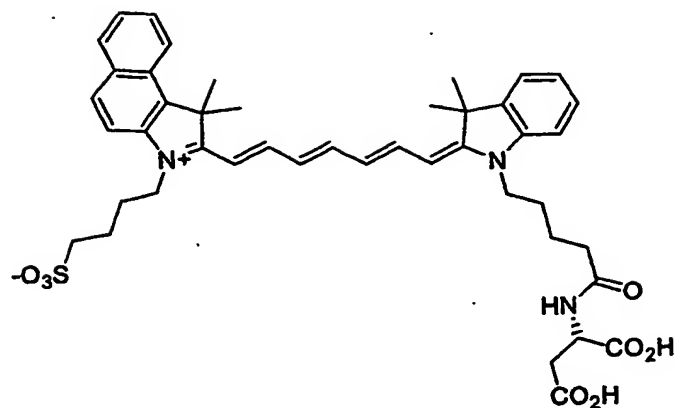


【0058】

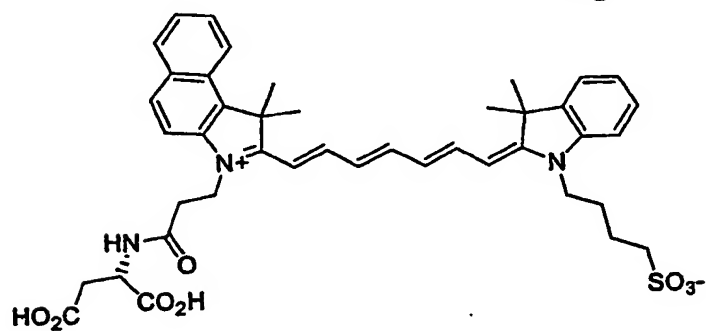
特2002-109794

【化17】

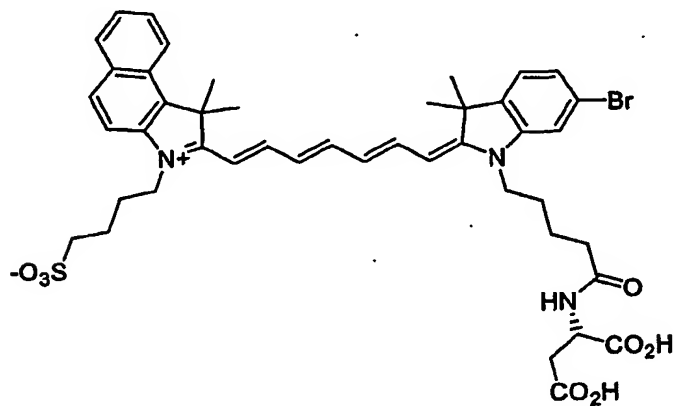
化合物 17



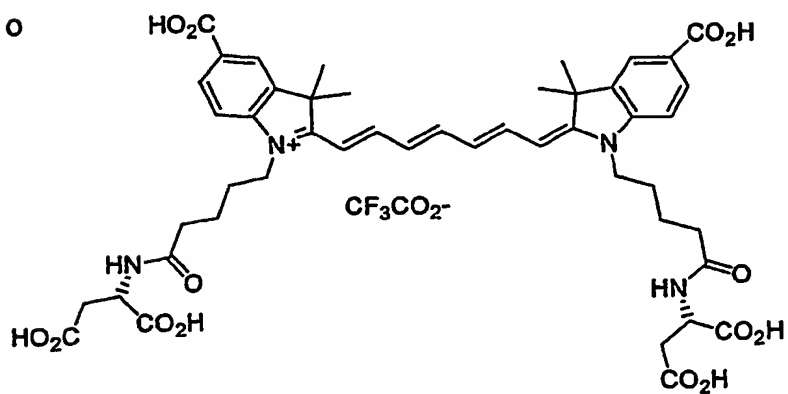
化合物 18



化合物 19



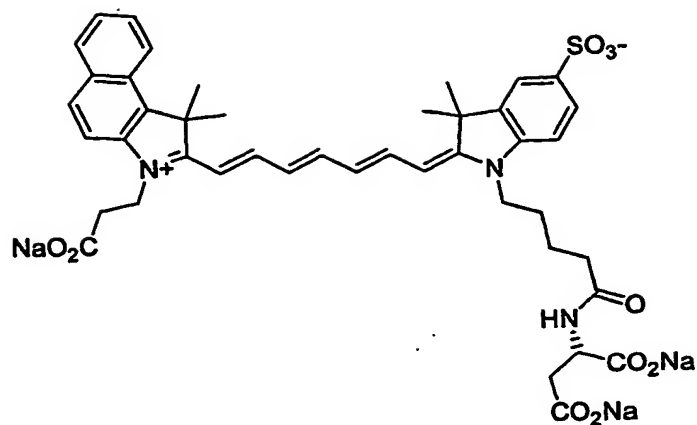
化合物 20



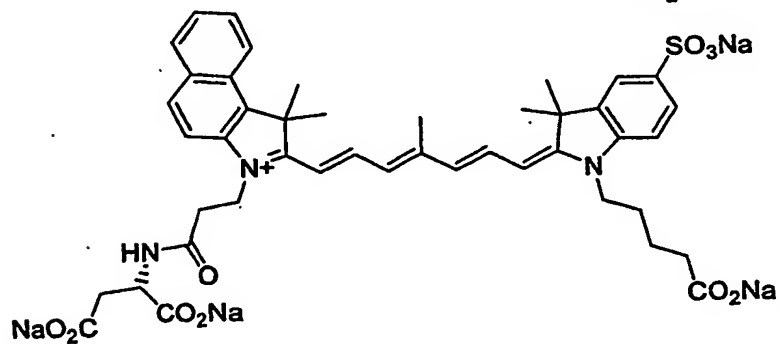
【0059】

【化18】

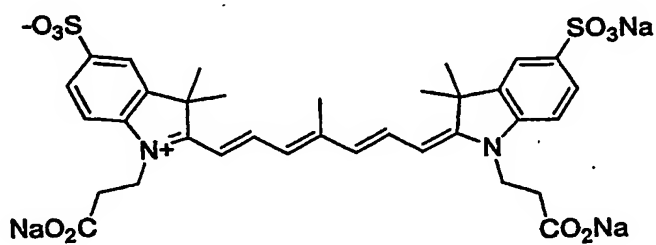
化合物 2 1



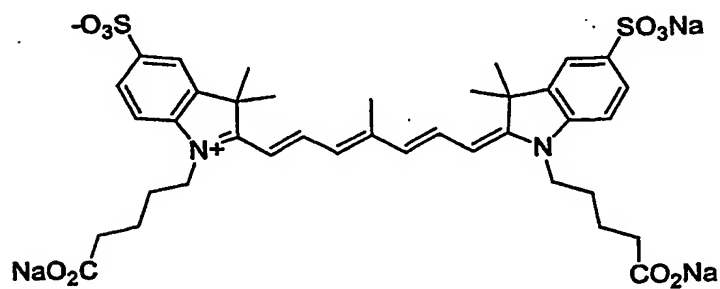
化合物 2 2



化合物 2 3



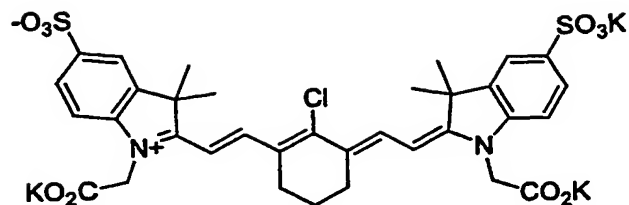
化合物 2 4



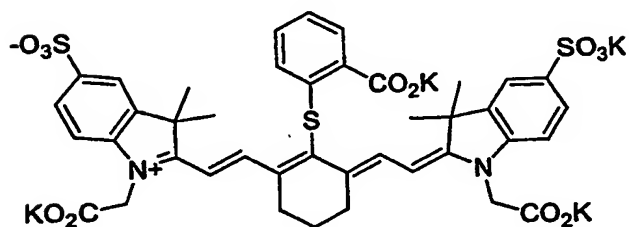
【0060】

【化 19】

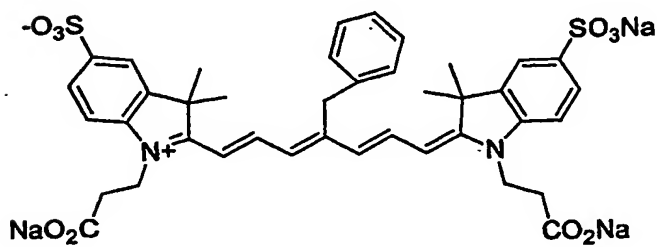
化合物 25



化合物 26



化合物 27

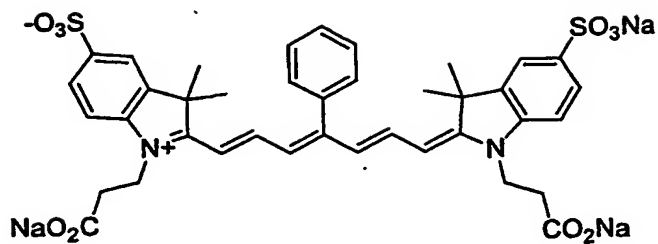


【0061】

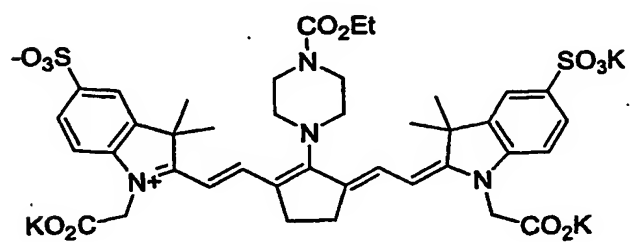


【化 20】

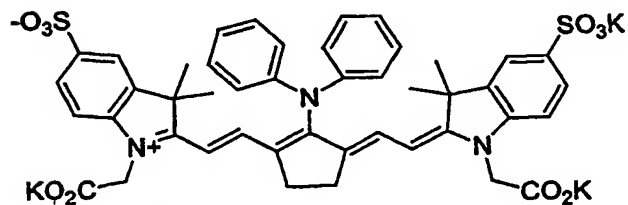
化合物 28



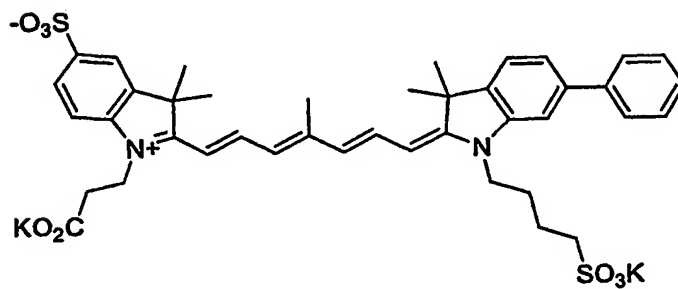
化合物 29



化合物 30



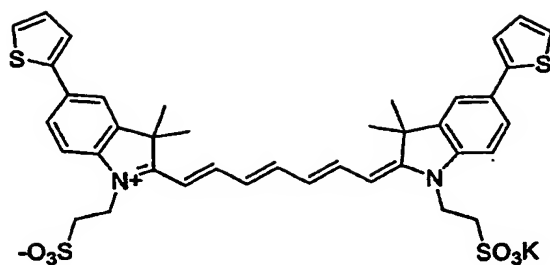
化合物 31



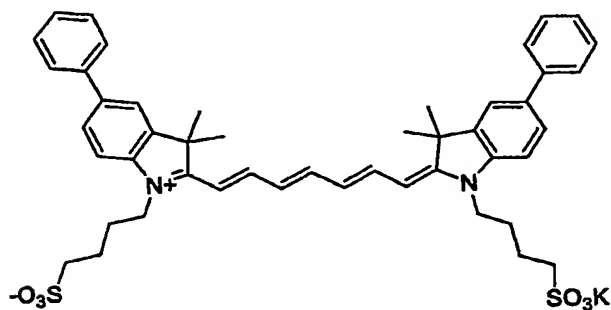
【0062】

【化 21】

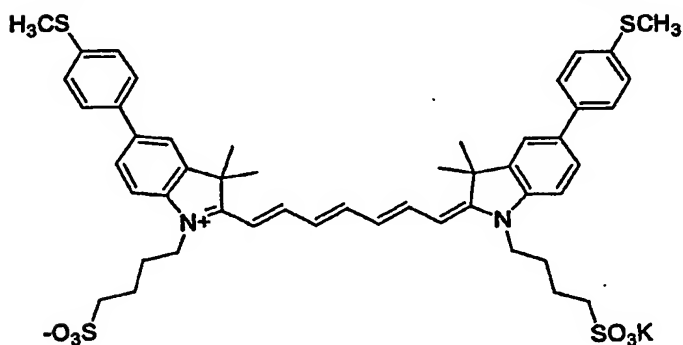
化合物 3 2



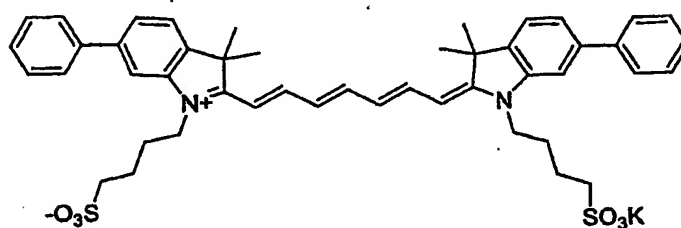
化合物 3 3



化合物 3 4



化合物 3 5



【0063】

上記一般式 (I) 又は (II) で表されるシアニン色素は、The Cyanine Dyes and Related Compounds, F.M. Hamer, John Wiley and Sons, New York, 1964, Cytometry, 11, 416-430 (1990), Cytometry, 11, 416-430 (1990), Cytometry, 12, 723-730 (1990), Bioconjugate Chem, 4, 105-111 (1993); Anal.Biochem. 217, 197-204 (1994), Tetrahedron, 45, 4845-4866 (1989), EP-A-0591820A1号

公報，EP-A-0580145A1号 公報等に記載されている公知のシアニン色素化合物の製造方法に準じて合成することができる。あるいは市販のシアニン色素から適宜公知の手法により半合成することもできる。より具体的には、ジアリル化合物とヘテロ環4級塩との反応により合成することができる

## 【0064】

上記一般式（I）又は（II）で表されるシアニン色素の製造方法は特に限定されず、各種の合成ルートに従って合成することができる。本明細書の実施例には本発明の代表的な化合物の具体的な製造方法が開示されている。従って、当業者は、実施例に記載された方法を参照することにより、また、必要に応じてそれらの方法に適宜の改変や修飾を加え、さらに、出発原料や試薬を適宜選択することによって、上記一般式に包含されるシアニン色素化合物を調製することが可能である。調製にあたっては、各種の縮合反応、付加反応、酸化反応、又は還元反応等の種々の反応から選ばれる反応を単独で又は組み合わせて用いることができる。これらの反応は成書に詳細に説明されている。例えば、[実験化学講座]（丸善株式会社発行、初版から第4版までの各版に含まれるそれぞれの分冊を利用できる）に単位操作として記載されている各種の方法や原料化合物を好適に利用できる。さらに、本発明の化合物の合成は特にPCT/JP01/06689の明細書に具体的に記載されており、その開示を参照によってここに取り込む。

## 【0065】

例えば、これらの製造において、上記に定義した官能基が反応工程において変化するか、または調製のための反応工程を実施するのに不適切な場合には、有機合成化学の分野で常套的に使用される種々の方法、例えば官能基の保護や脱保護等の手段、あるいは、酸化、還元、加水分解等の処理を利用することにより、所望の工程を効率よく行うことができる場合がある。上記工程における合成中間体化合物および目的化合物は、有機合成化学で用いられている常套的な精製法、例えば濾過、抽出、洗浄、乾燥、濃縮、再結晶、各種クロマトグラフィー等の処理に付することにより単離精製することができる。また、合成中間体産物は特に単離することなく次の反応に供することも可能である。

## 【0066】

本発明の近赤外蛍光造影剤の活性成分としては、一般式（I）または一般式（II）で表される化合物またはその塩を単独で、または組み合わせて用いることができる。より具体的には、該活性成分は該造影剤に注射用蒸留水、生理食塩水やリンゲル液等の溶媒に懸濁または溶解した形態で含めることができる。必要に応じて、薬理学的に許容される担体、賦形剤等の添加剤を含めることができる。これらの添加剤には薬理学的に許容できる電解液、緩衝液、界面活性剤および浸透圧を調節するための物質、例えばシクロデキストリン、リポソーム等の安定性や溶解性を改善する物質等が含まれる。通常当分野で用いられている任意の添加剤が使用される。本発明の近赤外蛍光造影剤は、特に臨床用に医薬として使用する場合には、無菌工程を経て製造されることが好ましい。

## 【0067】

該造影剤は、血管（静脈、動脈）内、経口内、腹腔内、皮下、皮内、膀胱内、気管支内等へ注入、噴霧もしくは塗布等により生体内に投与することができる。好ましくは、本造影剤は水性溶液、乳剤または懸濁液の形態で血管内投与することができる。

## 【0068】

本発明の近赤外蛍光造影剤の投与量は、診断されるべき部位を検出できる量であれば特に限定されない。投与量は使用する近赤外蛍光を発する化合物の種類、投与される対象の年齢、体重、及び標的とする臓器等によって適宜増減できる。典型的には、通常、用量は該化合物の重量で0.1~100mg/kg体重、好ましくは0.5~20mg/kg体重の範囲であればよい。

## 【0069】

また、本発明の造影剤はヒト以外にも各種動物用の造影剤としても好適に用いることができる。その投与形態、投与経路、投与量等は対象となる動物の体重や状態によって適宜選択される。

## 【0070】

本発明の上記一般式（I）及び（II）で表される化合物は腫瘍組織に高度に蓄積される性質を有する。その性質を利用して本発明はまた腫瘍組織を特異的に造影することができる蛍光造影剤を提供する。さらに、本発明の一連の化合物は、

血管内において長時間の滞留性が有するため、本発明の蛍光造影剤は血管造影法にもまた有用である。

#### 【0071】

本発明の蛍光造影法は、本発明の近赤外蛍光造影剤を用いることを特徴とする。該造影法は当業者には公知の方法を用いて行われ、励起波長、検出すべき蛍光波長等のような各パラメーターは、最適の画像及び評価を得るために、投与する近赤外蛍光造影剤の種類、投与する対象に応じて適宜決定される。本発明の近赤外蛍光造影剤を測定対象物に投与してから本発明の蛍光造影法を用いて蛍光造影を開始するまでの時間も、投与する近赤外蛍光造影剤の種類、投与する対象等によって異なる。例えば腫瘍造影を目的として、一般式（I）及び一般式（II）で表される化合物を含む造影剤を投与する場合、投与後10分～24時間程度の経過時間が例示される。経過時間が短すぎるとあらゆる部位からの蛍光が強すぎて目的とする部位とそれ以外の部位との識別が困難であり、長すぎると該造影剤が体外に排泄されてしまう。血管造影を目的とする場合には一般式（I）及び一般式（II）で表される化合物は投与直後または約30分で検出される。

#### 【0072】

例えば、本発明の蛍光造影法は以下の工程によって行うことができる。本発明の近赤外蛍光造影剤を診断対象に投与した後、励起光を発生する装置を用いて励起光を測定対象に照射する。その後、該励起光により生じる該近赤外蛍光造影剤からの蛍光を蛍光検出器で検出する。励起するための波長は、使用する近赤外蛍光造影剤の種類によって異なり、該化合物が効率よく近赤外領域に蛍光を発すればとくに限定されない。好ましくはより生体透過性に優れた近赤外光が用いられる。また、検出すべき近赤外蛍光の波長も使用する造影剤によって異なる。一般に、600～1000nm、好ましくは700～850nmの波長が用いられ、700～1000nm、好ましくは750～900nmの近赤外蛍光が検出される。この場合、励起光源を発する装置としては、各種レーザー光源（例えばイオンレーザー、色素レーザー、半導体レーザー）、ハロゲン光源、キセノン光源等の通常の励起光源が用いられる。必要であれば最適な励起波長を得るために各種光学フィルターを使用することができる。同様に、蛍光の検出に際しても、該近赤外蛍光造影剤からの蛍光のみを選択

すべく各種光学フィルターを使用することが可能である。

### 【0073】

検出された蛍光は、蛍光画像を構築するために蛍光情報としてデータ処理され、記録されることができる。蛍光画像を作成する方法としては、標的組織を広範囲に照射し、CCDカメラによって蛍光を検出し、得られた蛍光情報を画像処理する方法、光CT装置を用いる方法、内視鏡を用いる方法、眼底カメラを用いる方法等が挙げられる。

### 【0074】

本発明の蛍光造影法は、生体に害を及ぼすことなく、全身疾患、腫瘍、血管等を可視化することが可能である。

### 【0075】

#### 【実施例】

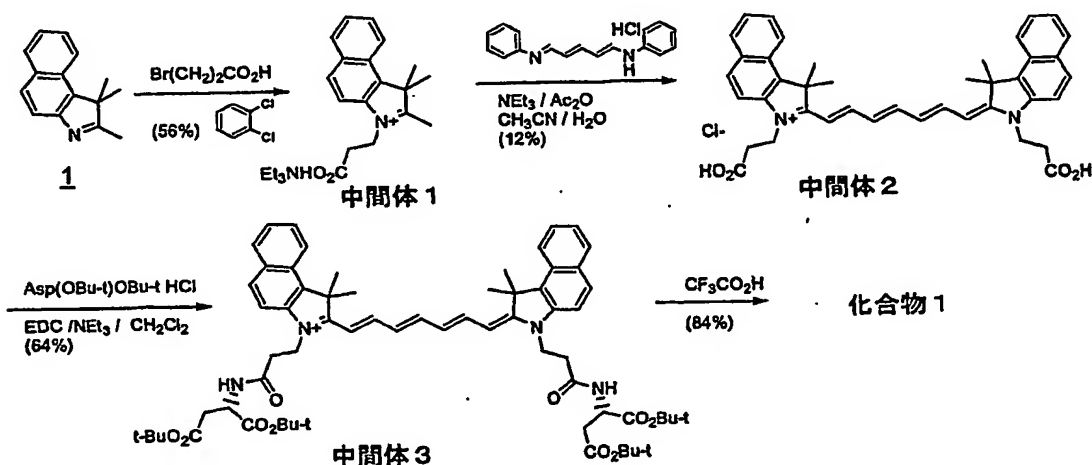
本発明を合成例及び試験例を挙げてより具体的に説明する。しかしながら、本発明の範囲は以下の実施例に限定されるものではない。以下の実施例において、化合物の連続番号は化学構造式とともに上に列挙した化合物の番号に対応する。

### 【0076】

実施例1：化合物、化合物2及び化合物3の合成

化合物1の合成経路を以下に示す。

#### 【化22】



## 【0077】

## 中間体1の合成

出発物質1 (20.9 g、0.1 mol)、2-ブロモプロピオン酸 (23.0 g、0.15 mol)、及びo-ジクロロベンゼン (20 ml) を加熱し、140℃にて2時間攪拌した。反応終了後、その反応混合物にアセトン (200 ml) を加え、室温まで冷却し、その後生成した結晶を濾過して化合物1を得た (20.3 g、収率：56%)

## 【0078】

## 中間体2の合成

上記で得られた中間体1 (10.0 g、28 mmol) 及び1,7-ジアザ-ジフェニル-1,3,5-ヘプタトリエン1塩酸塩 (3.9 g、14 mmol) をアセトニトリル (70 ml) 及び水 (11 ml) に溶解し、得られた溶液にトリエチルアミン (8.4 g、91 mmol) 及び無水酢酸 (8.5 g、91 mmol) を加え、その混合物を室温にて一晩攪拌した。反応混合物を0.1 N塩酸 (900 ml) に滴下し、沈殿した結晶を濾取した。この結晶をカラムクロマトグラフィー (展開溶媒：塩化メチレン：メタノール=95:5~90:10) によって精製し、中間体2を得た (2.1 g、収率：12%)。

## 【0079】

## 中間体3の合成

上記で得られた中間体2 (1.0 g、1.5 mmol)、L-アスパラギン酸-γ-tert-ブチルエステル1水和物 (1.3 g、4.5 mmol)、4-ジメチルアミノピリジン (40 mg、0.3 mmol) を塩化メチレン (50 ml) に溶解し、その溶液を氷上で冷却した。得られた溶液に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (EDC) (700 mg、4 mmol) 及びトリエチレンアミン (340 mg、3 mmol) を加え、4℃にて一晩攪拌した。反応混合物に塩化メチレン (200 ml) 及び1 N塩酸 (200 ml) を加え、その後塩化メチレン層を抽出し、飽和食塩水 (200 ml) にて洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を減圧留去し、カラムクロマトグラフィー (展開溶媒：酢酸エチル：メタノール=95:5~80:20) によっ

て精製し、中間体3を得た(1.1g、収率:64%)。

# 【0080】

化合物1、化合物2、及び化合物3の合成

中間体3(500mg, 0.5mmol)をトルフルオロ酢酸(5ml)に溶解し、4℃にて一晩反応させ、その後トリフルオロ酢酸を減圧留去した。得られた残渣に水(50ml)を加え、その後生じた結晶を濾取し、水及び酢酸エチルにて洗浄し、化合物1を得た(390mg、収率:90%)。

化合物1をセファデックス(LH-20, ファルマシア製)(展開溶媒:メタノール)を用いたカラムクロマトグラフィーにて精製し、化合物2を得た。

化合物1をイオン交換樹脂カラムCR 11(三菱化学製)に通すことにより、化合物3を得た。

# 【0081】

化合物1

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.98 (s, 12H), 2.70 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 2.80 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 3.30 (MeOH), 4.50 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.60 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 4.80 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 6.40 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.63 (dd,  $J=13.2, 13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.40-7.50 (m, 2H), 7.58-7.66 (m, 5H), 7.95-8.07 (m, 6H), 8.20 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H)

# 【0082】

化合物2

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.99 (s, 12H), 2.72 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 2.80 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 3.30 (MeOH), 4.50 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.60 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 4.80 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 6.38 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.61 (dd,  $J=13.2, 13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.40-7.50 (m, 2H), 7.58-7.67 (m, 5H), 7.96-8.07 (m, 6H), 8.21 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H)

# 【0083】

化合物3

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.98 (s, 12H), 2.56-2.65 (m, 4H), 2.75-2.85 (m, 4H), 3.30 (MeOH), 4.45-4.50 (m, 4H), 4.80 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 6.20 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.65 (dd,  $J=13.2, 13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.40-7.50 (m, 2H), 7.58-7.70 (m, 5H), 7.95-8.07 (m, 6H), 8.20 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H)



【0084】

実施例 2：化合物 5 の合成

化合物 5 を中間体 1 及び 1, 7-ジアザ-5-メチル-1, 7-ジフェニル-1, 3, 5-ヘプタトリエン 1 水和物から化合物 1 と同様な手法によって合成した。

【0085】

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  2.00 (s, 12H), 2.44 (s, 3H), 2.73 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 2.82 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 3.31 (MeOH), 4.50 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.69 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 4.88 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 6.41 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.65 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.43-7.50 (m, 2H), 7.58-7.67 (m, 4H), 7.95-8.05 (m, 4H), 8.10-8.27 (m, 4H)

【0086】

実施例 3：化合物 6 の合成

L-グルタミン酸-ジ- $\gamma$ -ブチルエステル 1 水和物を L-アスパラギン酸-ジ- $\gamma$ -ブチルエステル 1 水和物の代りに用いること以外は化合物 1 と同様な手法により、化合物 6 を中間体 1 及び 1, 7-ジアザ-5-メチル-1, 7-ジフェニル-1, 3, 5-ヘプタトリエン 1 水和物から合成した。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.80-2.15 (m, 4H), 2.01 (s, 12H), 2.28 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 2.44 (s, 3H), 2.82 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 3.31 (MeOH), 4.40-4.50 (m, 2H), 4.51 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.88 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 6.42 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.65 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.42-7.50 (m, 2H), 7.57-7.67 (m, 4H), 7.95-8.05 (m, 4H), 8.10-8.27 (m, 4H)

【0087】

実施例 4：化合物 7 の合成

化合物 7 を 2, 3, 3-トリメチルインドレニンから化合物 1 と同様な手法により合成した。

【0088】

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.70 (s, 12H), 2.05-2.13 (m, 4H), 2.55 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 2.78-2.92 (m, 4H), 3.30 (MeOH), 4.10 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.89 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 6.45 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.50 ( $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.29-7.50 (m, 8H), 7.92 (dd,  $J$

=13.2, 13.2 Hz, 2H)

【0089】

#### 実施例5：化合物8の合成

1, 7-ジアザ-5-メチル-1, 7-ジフェニル-1, 3, 5-ヘプタトリエン1塩酸塩を1, 7-ジアザ-1, 7-ジフェニル-1, 3, 5-ヘプタトリエン1水和物の代りに用いること以外は化合物1と同様な手法により、化合物8を2, 3, 3-トリメチルインドレニンから合成した。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.70 (s, 12H), 1.72-1.90 (m, 8H), 2.35-2.39 (m, 7H), 2.73-2.84 (m, 4H), 3.30 (MeOH), 4.08 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.66 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 4.89 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 6.33 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.63 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.18-7.50 (m, 8H), 8.05 (dd,  $J=13.2, 13.2\text{Hz}$ , 2H)

【0090】

#### 実施例6：化合物9の合成

化合物9を化合物1と同様の手法にて6-フェニル-2,3,3-トリメチルインドレニン (US特許番号 6,004,536の明細書に記載の方法によって合成) から合成した。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.75 (s, 12H), 2.05-2.15 (m, 4H), 2.45-2.55 (m, 4H), 2.75-2.84 (m, 4H), 3.30 (MeOH), 4.20 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.80 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 6.38 ( $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.62 ( $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.43-7.70 (m, 17H), 7.95 (dd,  $J=13.2, 13.2\text{Hz}$ , 2H)

【0091】

#### 実施例7：化合物10の合成

化合物10を化合物1と同様の手法にて6-プロモ-2,3,3-トリメチルインドレニンから合成した。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.68 (s, 12H), 2.00-2.15 (m, 4H), 2.40-2.55 (m, 4H), 2.77-2.92 (m, 4H), 3.30 (MeOH), 4.08 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.82 (m, 2H), 6.38 ( $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.65 ( $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.30-7.40 (m, 4H), 7.50-7.72 (m, 3H), 7.90-8.02 (m, 2H)

【0092】

# 実施例 8 : 化合物 11 の合成

化合物 11 を化合物 1 と同様の手法にて 5-フェニル-2,3,3-トリメチル-インドレニンから合成した。

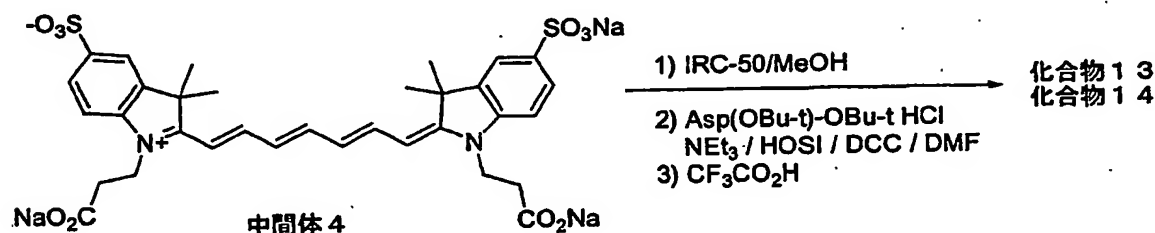
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.78 (s, 12H), 2.39 (s, 3H), 2.70-2.84 (m, 8H), 3.30 (MeOH), 4.30-4.46 (m, 4H), 4.60-4.68 (m, 2H), 6.39 (J=13.2Hz, 2H), 6.66 (J=13.2Hz, 2H), 7.30-7.48 (m, 9H), 7.56-7.72 (m, 3H), 8.05 (J=13.2Hz, 13.2Hz)

【0093】

# 実施例 9 : 化合物 13 及び化合物 14 の合成

化合物 13 及び化合物 14 の合成経路を下記に示す。

【化 23】



【0094】

5-スルホ-2,3,3-トリメチルインドレニン (特公平2-233658号に記載の方法にて調製) 及び1,7-ジアザ-1,7-ジフェニル-1,3,5ヘプタトリエン 1 塩酸塩をトリエチルアミン及び無水酢酸の存在下でメタノール中で反応させて得られた中間体化合物(375 mg) をメタノール5 mlに溶解し、その後カチオン性イオン交換樹脂IRC-50 (オルガノ、展開溶媒; メタノール) で満たしたカラムに通した。溶媒除去してカルボン酸をプロトンフォームにした。得られた生成物をジメチルホルムアミド3 mlに溶解し、その溶液に、ジブチルアスパラギン酸塩酸塩338 mg (1.2 mmol)、ジメチルアミノピリジン24 mg (0.2 mmol)、及び トリエチルアミン121 mg (1.2 mmol)を添加し、その後、その混合物を氷浴上で冷却した。その混合物にヒドロキシスクシンイミド(HOSI)230 mg (2 mmol) 及びN,N-ジクロロヘキシルカルボジイミド (DCC) 288 mg (1.4 mmol)を加え、得られた混合物を一晩攪拌した。反応混合物に酢酸エチル/ヘキサン (1 : 1) の混合溶媒200 mlを加え、沈

殿した結晶を濾取した。結晶をカラムクロマトグラフィー（展開溶媒：塩化メチレン：メタノール＝10：1から2：1）によって精製し、ジアミド化合物（135 mg）及びモノアミド化合物（94 mg）を得た。

## 【0095】

得られたジアミド化合物（120 mg）及びモノアミド化合物（60 mg）のそれぞれをトリフルオロ酢酸2 ml に溶解し、その後その混合物を室温にて1時間攪拌した。反応混合物を水／メタノール（1/1（v/v））に溶解し、セファデックス（LH-20、ファルマシア製、展開溶媒：メタノール）を用いたカラムクロマトグラフィーによって精製した。生じた結晶を少量のメタノールに溶解し、その溶液に飽和酢酸カリウムメタノール溶液を加えた。沈殿した結晶を濾取し、化合物13（35 mg、収率7%）及び化合物14（15 mg、収率5%）。

## 【0096】

## 化合物13

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  1.73 (s, 12H), 2.50-2.65 (m, 4H), 2.68-2.73 (m, 4H), 4.28-4.38 (m, 4H), 4.39-4.50 (m, 2H), 4.90 ( $\text{D}_2\text{O}$ ), 6.47 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.74 (t,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.40-7.50 (m, 2H), 7.60 (t,  $J=13.2\text{Hz}$ , 1H), 7.80-8.05 (m, 6H)

## 【0097】

## 化合物14

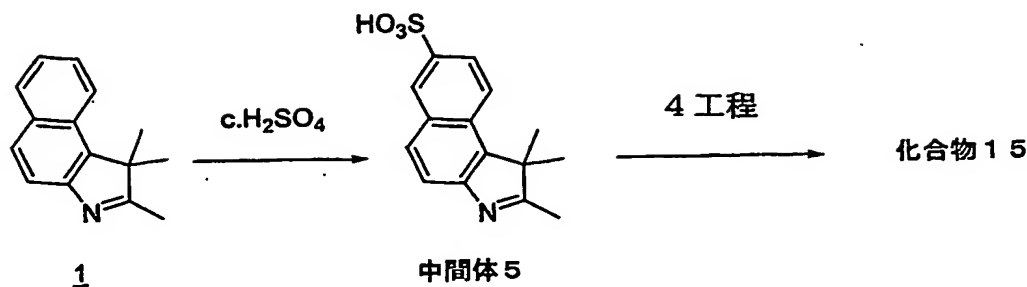
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  1.65 (s, 6H), 1.70 (s, 6H), 2.40 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 2.58 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 2.70 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 4.18-4.30 (m, 4H), 4.90 ( $\text{D}_2\text{O}$ ), 6.18 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 1H), 6.34 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 1H), 6.48-6.62 (m, 2H), 7.20 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 1H), 7.30 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 1H), 7.48 (t,  $J=13.2\text{Hz}$ , 1H), 7.68-7.95 (m, 6H)

## 【0098】

## 実施例10：化合物15の合成

化合物15の合成経路を下記に示す。

【化 24】



【0099】

出発物質 (41.8 g, 0.2 mol) を濃硫酸 (156 ml, 2.9 mol) に溶解し、140℃にて1時間反応させ、その後その混合物を80℃まで冷却した。得られた溶液を氷水 (300 ml) に添加し、水酸化ナトリウム (96.6 g, 2.4 mol) を水 (100 ml) に溶解させることによって得られた溶液を注意深くその混合物に加えた。沈殿した結晶を濾取し、水 (120 ml) にて洗浄した。得られた粗結晶に水 (300 ml) 及びメタノール (100 ml) を加え、その混合物を30分間攪拌しながら還流し、その後室温まで冷却した。得られた結晶を濾取し、水 (100 ml) 及びメタノール (120 ml) にて洗浄し、中間体 5 を得た (37.9 g、収率: 66%)。

【0100】

化合物 15 を化合物 13 と同様の手法にて中間体 5 から得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  2.00 (s, 12H), 2.72 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 2.82 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 3.30 (MeOH), 4.58 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.70 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 4.86 ( $\text{H}_{2\text{O}}$ ), 6.42 (d,  $J=13.2\text{Hz}$ , 2H), 6.62 (dd,  $J=13.2, 13.2\text{Hz}$ , 2H), 7.62-7.70 (m, 3H), 7.95-8.12 (m, 6H), 8.28 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 8.42 (s, 2H)

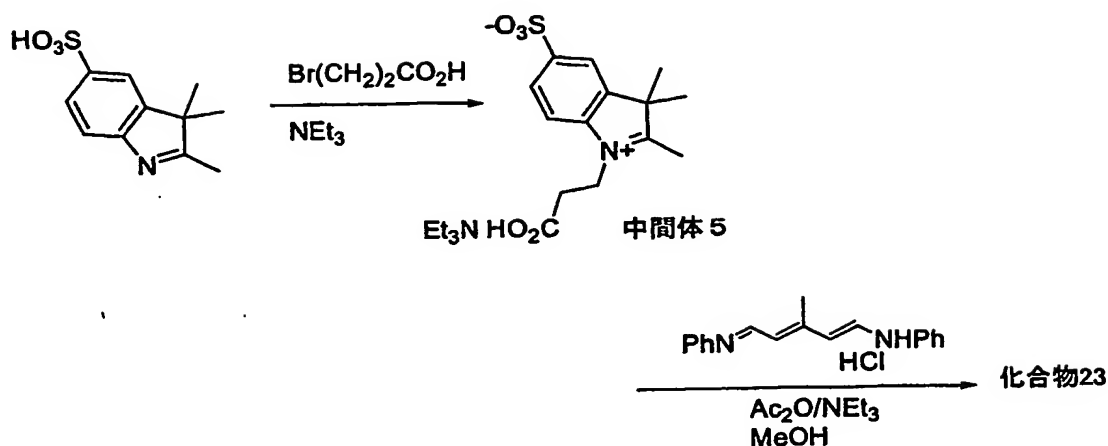
【0101】

実施例 11 : 化合物 23 の合成

化合物 23 の合成経路を下記に示す。

【0102】

## 【化 25】



## 【0103】

## 中間体 6 の合成

5-スルホ-2,3,3-トリメチルインドレイン（特開平2-233658号に記載の方法によって合成）（24.0 g, 0.1 mol）、2-ブロモプロピオン酸（23.0 g, 0.15 mol）、及びトリエチルアミン（10.1 g, 0.1 mol）を熱し、160℃にて6時間攪拌した。反応終了後、反応混合物にメタノール（200 ml）を加え、室温まで冷却し、その後生じた結晶を濾取し、中間体 6 を得た（6.0 g、収率：19.3%）。

## 【0104】

## 化合物 23 の合成

上記で得られた中間体 1（3.1 g, 10 mmol）及び1,7-ジアザ-1,7-ジフェニル-4-メチル-1,3,5-ヘプタトリエン 1 塩酸塩（特開平8-295658号（1.5 g, 5 mmol）をメタノール（20 ml）に溶解し、得られた溶液にトリエチルアミン（2.5 g, 25 mmol）及び無水酢酸（4.6 g, 45 mmol）を加え、その混合物を室温にて3時間攪拌した。反応混合物に酢酸ナトリウム（3.3 g, 33 mmol）を加え、室温にて30分間攪拌した。生じた結晶を濾取し、メタノール（20 ml）で洗浄して化合物 23 を得た（2.0 g、収率：50.0%）。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm) 1.60 (s, 12H), 2.30 (s, 3H), 2.60 (t, 4H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 4.20 (t, 4H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 6.25 (d, 2H,  $J=14.5\text{Hz}$ ), 6.55 (dd, 2H, 14.5, 14.

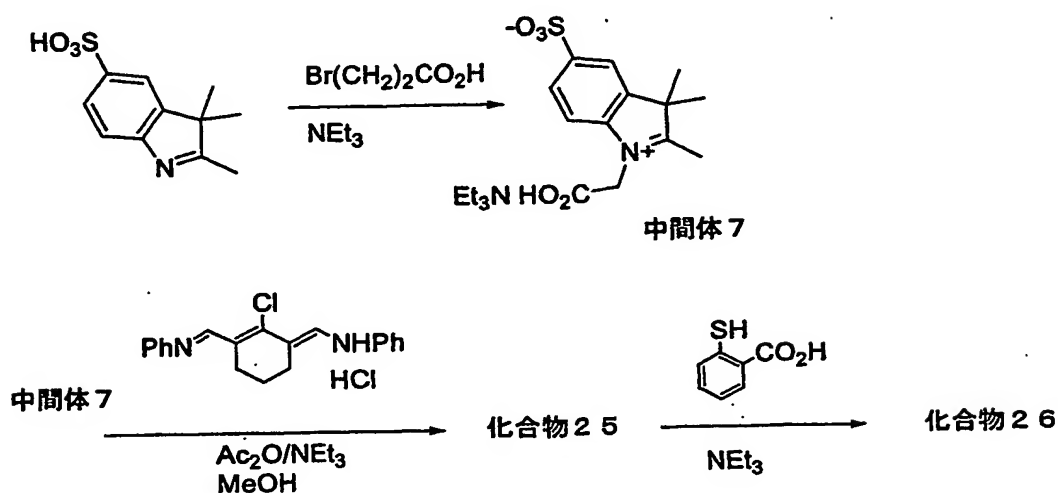
5Hz), 7.25 (d, 2H, J=7.0Hz), 7.70-7.80 (m, 4H), 8.00 (dd, 2H, J=14.5, 14.5Hz)

【0105】

実施例12：化合物25及び化合物26の合成

化合物25及び化合物26の合成経路を下記に示す。

【化26】



【0106】

中間体7の合成

中間体6と同様の方法にて中間体7を5-スルホ-2,3,3-トリメチルインドレニン及びプロモ酢酸から合成した(16.6 g)。

【0107】

化合物25の合成

化合物23と同様の手法にて化合物25を中間体7及び中間体8(Zh. Org. Khim., 13, pp.1189-1192, 1977に記載の方法に従って得られた)から合成した(15.0 g)。

MS(FAB-, グリセリン)  $m/z = 844$

【0108】

化合物26の合成

化合物25 (4.2 g, 5 mmol) 及びトリエチルアミン (1.0g)を水 (20 ml)に加え、その後得られた溶液に  $\alpha$ -メルカプト安息香酸(0.93 g, 6 mmol)を加え室温

にて1時間攪拌した。得られた混合物に酢酸カリウム (2.0 g, 20 mmol)を加えた後、エタノール(20 ml)を加え、生じた結晶を濾取し、化合物26を得た(1.3 g、収率: 27%)

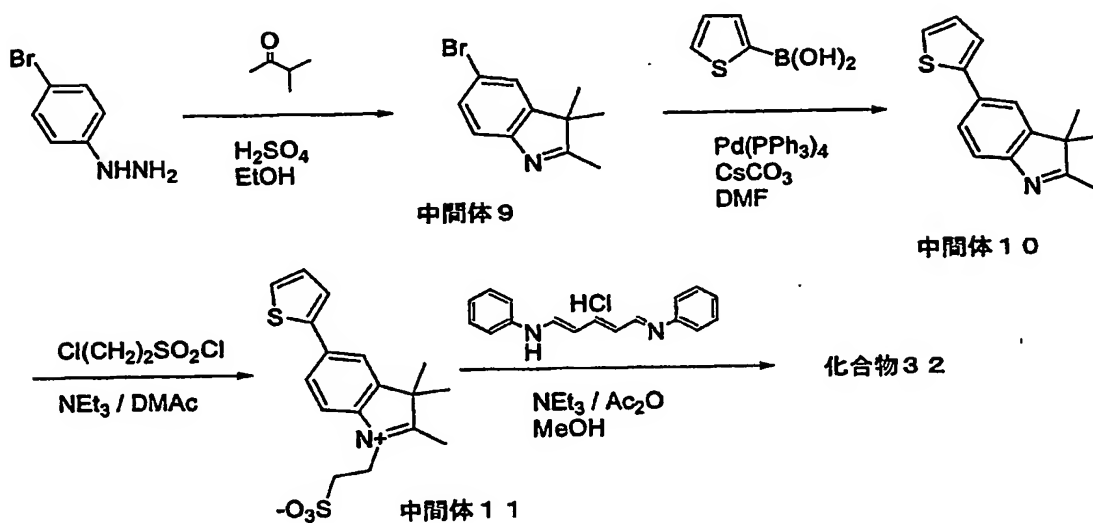
MS (FAB-, グリセリン)  $m/z$  = 962

【0109】

実施例13：化合物32の合成

化合物32の合成経路を下記に示す。

【化27】



【0110】

中間体9の合成

4-ブロモフェニルヒドラジン1塩酸塩 (73.8 g, 0.33 mmol) 及び 3-メチル-2-ブタノン (33.2 g, 0.40 mmol) をエタノール (450 ml)に溶解し、得られた溶液に濃硫酸(7.5 ml)を添加し、8時間攪拌しながら還流した。混合物を室温まで冷却した後、溶液を減圧下100 mlまで濃縮した。その残渣に、水 (400 ml) 及び酢酸エチル(400 ml)を加えた後、水層のpHを水酸化ナトリウム溶液にて7から8に調整した。得られた溶液を酢酸エチルにて抽出し、飽和食塩水にて洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させた。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒：ヘキサン：酢酸エチル=5:1 to 1:1)によって精製し、褐色液体として中間体9を得た(58.6 g、収率76%)

【0111】



## 中間体 10 の合成

中間体 9 (4.76 g, 20 mmol) 及びチオフェンボロニックアシッド (3.84 g, 30 mmol) をジメチルホルムアミド (50 ml) に加え、得られた溶液にパラジウムテトラキスフェニルホスフィン (1.16 g, 9 mmol) 及び塩化セシウム (13.3 g, 40 mmol) を加え、窒素雰囲気下 100℃ にて 4 時間加熱し攪拌した。水 (200 ml) を加えた後、混合物を酢酸エチル (200 ml) にて抽出し、飽和食塩水にて洗浄し、その後有機層を無水硫酸ナトリウム上乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: ヘキサン: 酢酸エチル = 2:1 to 1:1) によって精製し、褐色固体として中間体 10 を得た (2.8 g、収率: 58%)。

## 【0112】

## 中間体 11 の合成

中間体 10 (1.40 g, 6 mmol) 及びトリエチルアミン (0.59 g, 6 mmol) をジメチルホルムアミド (3 ml) に加え、その混合物に 2-クロロエタンスルホニルクロリド (1.42 g, 9 mmol) を氷冷下で滴下した。室温にて 30 分間攪拌を続けた後、その溶液に水酸化ナトリウム (0.23 g, 6 mmol) を水 (2 ml) に溶解することによって得られた溶液を加え、さらに室温にて 1 時間攪拌した。その混合物に、酢酸エチルを加え、上層をデカンテーションによって除去した。残渣を乾燥して中間体 11 を得た。その中間体 11 を更なる精製をすることなく次の反応に用いた。

## 【0113】

## 化合物 32 の合成

上記で得られた中間体 11 及び 1,7-ジアザ-1,7-ジフェニル-1,3,5-ヘプタトリエン 1 塩酸塩をメタノール (5 ml) に溶解し、得られた溶液にトリエチルアミン (160 mg, 2 mmol) 及び無水酢酸 (230 mg, 2 mmol) を加えた後、その混合物を室温にて 7 時間攪拌した。この混合物に酢酸エチル (20 ml) を加え沈殿した結晶を濾取し、酢酸エチル (10 ml) にて洗浄した。この結晶をメタノール (10 ml) に溶解した後、その溶液に飽和酢酸カリウムメタノール溶液 (10 ml) を加えた。沈殿した結晶を濾取し、メタノール (5 ml) にて洗浄した。結晶をセダデックス LH-20 (溶離液: メタノール) によって精製し、化合物 32 を得た (15 mg、収率: 2

% (中間体 2 から) )。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 1.75 (s, 12H), 3.25 (t, 4H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 4.50 (t, 4H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 6.40 (d, 2H,  $J=14.5\text{Hz}$ ), 6.63 (dd, 2H, 14.5, 14.5Hz), 7.07-7.12 (m, 2H), 7.33-7.45 (m, 6H), 7.53-7.75 (m, 5H), 7.96 (dd, 2H,  $J=14.5$ , 14.5Hz)

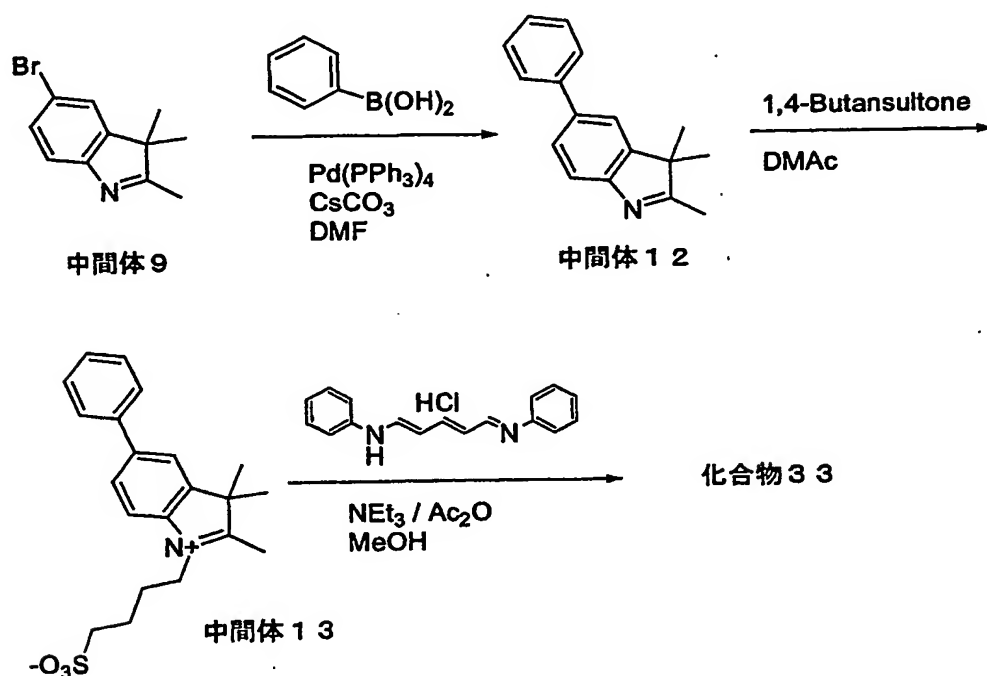
MS(FAB-, Glycerin)  $m/z$  = 760

【0114】

#### 実施例 14 : 化合物 33 の合成

化合物 33 の合成経路を下記に示す。

【化 28】



【0115】

#### 中間体 12 の合成

中間体 10 と同様の方法で中間体 9 及びジヒドロキシフェニルボランから中間

体 12 を合成した (3.6 g、収率: 77%)。

【0116】

中間体 13 の合成

中間体 12 (1.40 g, 6 mmol) 及び 1,4-ブタンサルトン (1.22 g, 9 mmol) をジメチルアセトアミド (2 ml) に溶解し、その溶液を 135℃ にて 5 時間攪拌した。その溶液に酢酸エチル (20 ml) を加え室温まで冷却し、その後沈殿した結晶を濾過し、酢酸エチルで洗浄して中間体 13 を得た (10 ml) (1.84 g、収率: 84%)。

【0117】

化合物 33 の合成

中間体 13 (1110 mg, 3 mmol) 及び 1,7-ジアザ-1,7-ジフェニル-1,3,5-ヘプタトリエン 1 塩酸塩 (285 mg, 1 mmol) をメタノール (5 ml) に溶解し、得られた溶液にトリエチルアミン (480 mg, 5 mmol) 及び無水酢酸 (670 mg, 7 mmol) を加え、その後室温にて 7 時間攪拌した。酢酸エチル (10 ml) を反応混合物に加え沈殿した結晶を濾取し、酢酸エチル (10 ml) にて洗浄した。結晶をメタノール (5 ml) に溶解し、飽和酢酸カリウムメタノール溶液 (10 ml) を加え、結晶を濾過し、5 ml で洗浄した。結晶をセファデックス LH-20 (溶離液: メタノール) にて精製し、化合物 33 を得た (250 mg、収率: 30%)。

【0118】

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 1.80 (s, 12H), 1.95-2.05 (m, 8H), 2.90 (t, 4H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 4.20 (t, 4H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 6.38 (d, 2H,  $J=14.5\text{Hz}$ ), 6.62 (dd, 2H, 14.5, 14.5Hz), 7.30-7.48 (m, 8H), 7.60-7.74 (m, 9H), 7.93 (dd, 2H,  $J=14.5, 14.5\text{Hz}$ )

MS (FAB-, ニトロベンジルアルコール)  $m/z = 803$

【0119】

実施例 15: 化合物 34 の合成

化合物 33 と同様の方法で化合物 34 を中間体 9 及び 4-メチル-メルカプトフェニルボロニックアシッドから合成した (15 mg)。

【0120】

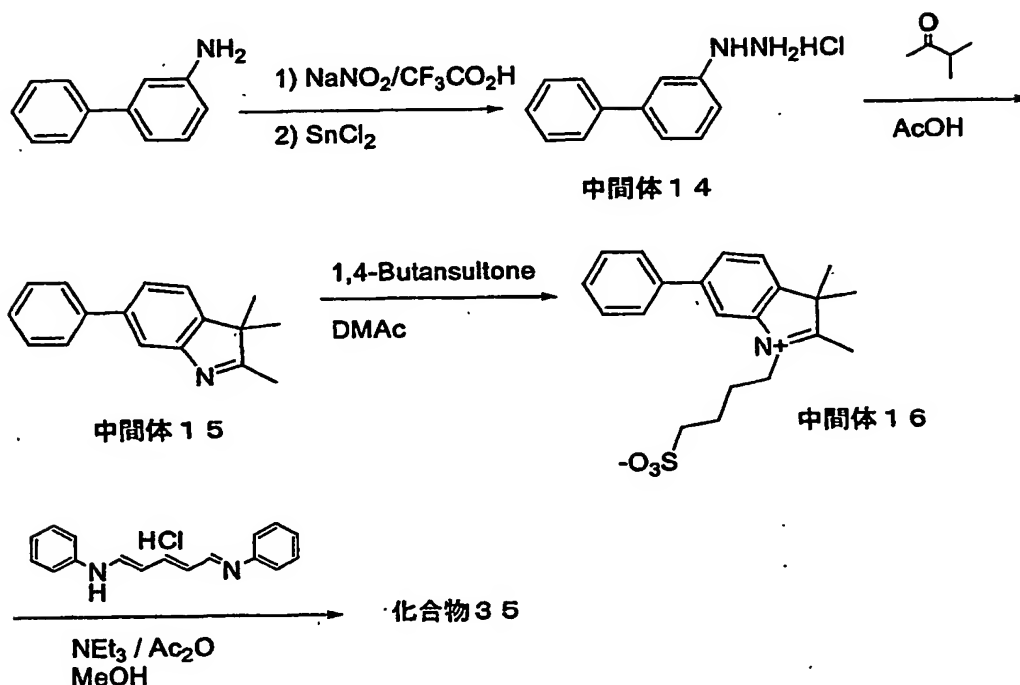
<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 1.68 (s, 12H), 1.95-2.10 (m, 8H), 2.50 (s, 6H), 3.00 (t, 4H, J=7.2Hz), 4.10 (t, 4H, J=7.2Hz), 6.30 (d, 2H, J=14.5Hz), 6.62 (dd, 2H, 14.5, 14.5Hz), 7.20-7.70 (m, 19H)

【0 1 2 1】

### 実施例 16：化合物 35 の合成

化合物 35 の合成経路を下記に示す。

【化 2 9】



【0 1 2 2】

### 中間体 14 の合成

3-アミノジフェニル (0.15 mol) 25.0 g をトリフルオロ酢酸100 mlに加え、その混合物を内部温度が0℃になるまで冷却した。その混合物に亜硝酸ナトリウム (0.15 mol) 10.2 gを水100 mlに溶解することによって得られた溶液を反応混合物の温度を5℃以下に保ちながら滴下により加えた。滴下による添加終了後、混合物を同温度で15分間攪拌し、その後、その混合物に塩化第一スズ(0.54 mol) 100 gを濃塩酸50 mlに溶解することによって得られた溶液を反応混合物の温度を10℃以下に保ちながら滴下により加えた。滴下による添加終了後、水250 mlの添

加によって沈澱をした結晶を濾取し、塩化メチレン200 mlで洗浄した。得られた中間体14を乾燥し、精製せずに中間体15の合成に使用した。

## 【0123】

## 中間体15の合成

上記で得られた中間体14（全量）及び3-メチル-2-ブタノン（0.15 mol）12.9 gを酢酸140 mlに加え、混合物を2時間30分攪拌しながら加熱した。混合物を室温まで冷却した後、沈澱した結晶を濾過によって除去し、濾液を4分の1量になるまで減圧下濃縮した。残渣に水300 ml及び酢酸エチル300 mlを加え、不溶性の沈澱をセライトを用いて濾過によって除去した。ろ液を酢酸エチル（300 ml, 200 ml×2）にて抽出し、抽出物を飽和炭酸水素ナトリウム溶液及び飽和生理食塩水で洗浄し、その後硫酸ナトリウム上で乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（展開溶媒：ヘキサン：酢酸エチル=3:1 to 2:1）によって精製した。得られた結晶をヘキサン50 mlから再結晶し、中間体15.13 gを得た（収率：4%）。

## 【0124】

## 化合物35の合成

中間体13及び化合物33と同様の方法で化合物35を中間体15から合成した（65 mg）。

MS(FAB-, グリセリン)  $m/z$  = 842,804

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm) 1.70 (s, 12H), 1.90-2.00 (m, 8H), 2.90 (t, 4H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 4.10 (t, 4H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 6.22 (d, 2H,  $J=14.5\text{Hz}$ ), 6.55 (dd, 2H, 14.5, 14.5Hz), 7.30-7.60 (m, 17H), 7.77 (dd, 2H,  $J=14.5, 14.5\text{Hz}$ )

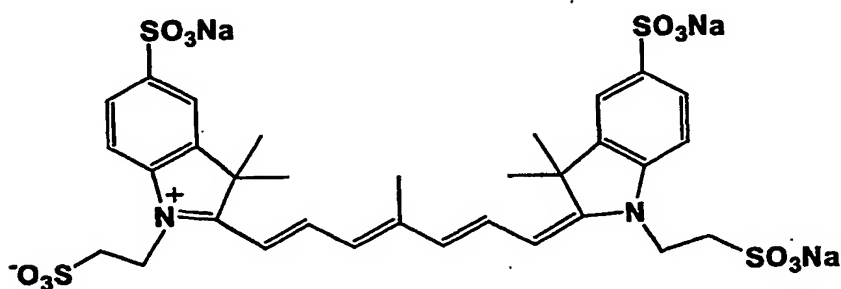
## 【0125】

## 試験例1：蛍光造影試験

マウス大腸癌(colon26カルシノーマ)由来の腫瘍組織片をBALB/cヌードマウス(5週齢、日本クレア株式会社)の左胸部皮下に移植した。10日後、直径約8mmに腫瘍が成長したところでマウスを実験に使用した。蛍光励起光源には、チタンサファイアレーザーを使用した。レーザー光をリング型ライトガイド(株式会社住田光学ガラス)を用いて、被検マウスに均一に照射(照射のバラツキは10%以内)した

。照射光出力は、マウスの皮膚表面付近で約 $40 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ になるように調整した。蛍光は、各化合物の極大励起波長を用いて励起し、マウスからの蛍光発光を、短波長カットオフフィルター（IR84、IR86、IR88、富士写真フイルム株式会社）を介してCCDカメラ（C4880、浜松ホトニクス株式会社）で検出し、撮影した。カットオフフィルターは、使用した化合物の励起波長に合わせて選択した。また、露光時間は各化合物の蛍光強度に応じて調節した。試験化合物2を生理食塩水またはリン酸緩衝液（pH7.4）に溶解し（0.5mg/ml）、5.0 mg/kg用量でマウスの尾静脈から投与した。試験化合物投与一定時間毎にマウスをジエチルエーテルで麻酔し、マウス全身の蛍光画像を撮影した。比較として、ICG（5 mg/kg、静脈内）および次の化合物（化合物A）を投与し、上記と同様の手法で造影を行った。結果を図1から図3に示す。

【化 3 0】



【0 1 2 6】

化合物2は対照化合物に比べて投与後より短い時間で腫瘍の鮮明な画像を与えた。腫瘍の位置は対照化合物の投与後1時間以内では明確ではなかった。これに対し、化合物2は投与後10～30分で明確な腫瘍の画像を与えることができ（図1）、蛍光造影剤として非常に効果的であることがわかった。

【0 1 2 7】

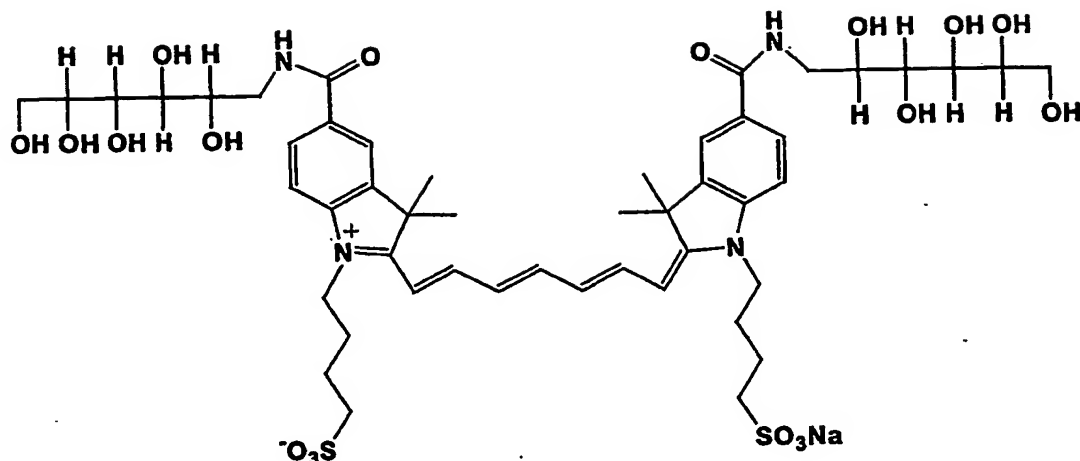
#### 実験例2：蛍光造影試験

担癌マウスを試験例1と同様にして調製し、照射の条件は試験例1で説明したのと同じにした。化合物5、化合物7、化合物10を試験化合物として用いた。各試験化合物（0.5mg/ml）を生理食塩水又はリン酸緩衝液（pH7.4）に溶解し、5.0 mg/kg用量で尾静脈からマウスに投与した。比較として、次の化合物（化合物

B、5 mg/kg、静脈内) をマウスに投与した。

【0128】

【化31】



【0129】

光はNd:Yagレーザー (Coherent Inc.)の第3高調波によって駆動した光学パラメトリックオシレーター (OPO) から構成される可変パルス固体レーザーシステムを用いて発生させた。 $\lambda_{ex}=740\text{nm}$ の励起波長を選択し、腫瘍を有しているヌードマウスに光ファイバーを用いて導いた。色素特異的蛍光発光をフィルター組み合わせ (Corison) と高密度化CCDカメラ (ローパーサイエンティフィック社) を用いて色素投与後異なる時間において造影した (図4)。標準投与量 5 mg/kgで側部尾静脈を介して静脈内に色素投与する前、投与後1分、10分、30分、60分、2時間、4時間、24時間に蛍光画像を撮影した。最初の60分においては、動物の体温を加熱パッドで38℃に保った。化合物の蛍光造影特性をヌードマウスモデルにおいて比較した。結果を図5から8に示す。化合物5、化合物7、及び化合物10は対照化合物 (化合物B) に比べて投与後より短い時間で腫瘍の鮮明な画像を与えた。腫瘍の位置は対照化合物の投与後1時間以内では明確ではなかった (図8)。これに対し、本発明の化合物は投与後10~30分で明確な腫瘍の画像を与えることができ (図5から7)、蛍光造影剤として非常に効果的であることがわかった。

【0130】

【発明の効果】

本発明の近赤外蛍光造影剤は、励起光により近赤外蛍光を放出することができる。該近赤外蛍光は生体組織透過性に優れているので、生体内の深層部分の病変を検出することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の化合物2投与後、一定時間毎における蛍光造影の結果を示す写真である。

【図2】 比較としてICG投与後、一定時間毎における蛍光造影の結果を示す写真である。

【図3】 比較として化合物A投与後、一定時間毎における蛍光造影の結果を示す写真である。

【図4】 試験例2における蛍光造影のために組み立てた実験系の模式図である、図中、SHGは第2高調波発生を表し；THGは第3高調波発生を表し；OPOは光学パラメトリックオシレーターを表す。

【図5】 本発明の化合物5投与後、一定時間毎における蛍光造影の結果を示す写真である。

【図6】 本発明の化合物7投与後、一定時間毎における蛍光造影の結果を示す写真である。

【図7】 本発明の化合物10投与後、一定時間毎における蛍光造影の結果を示す写真である。

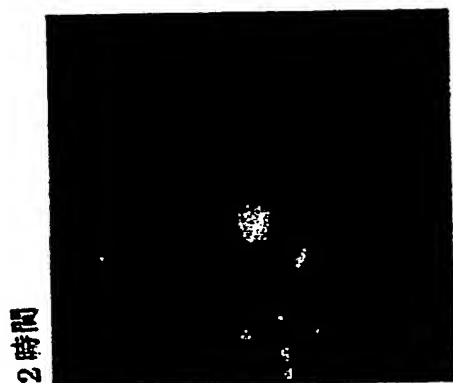
【図8】 比較として本発明の化合物B投与後、一定時間毎における蛍光造影の結果を示す写真である。



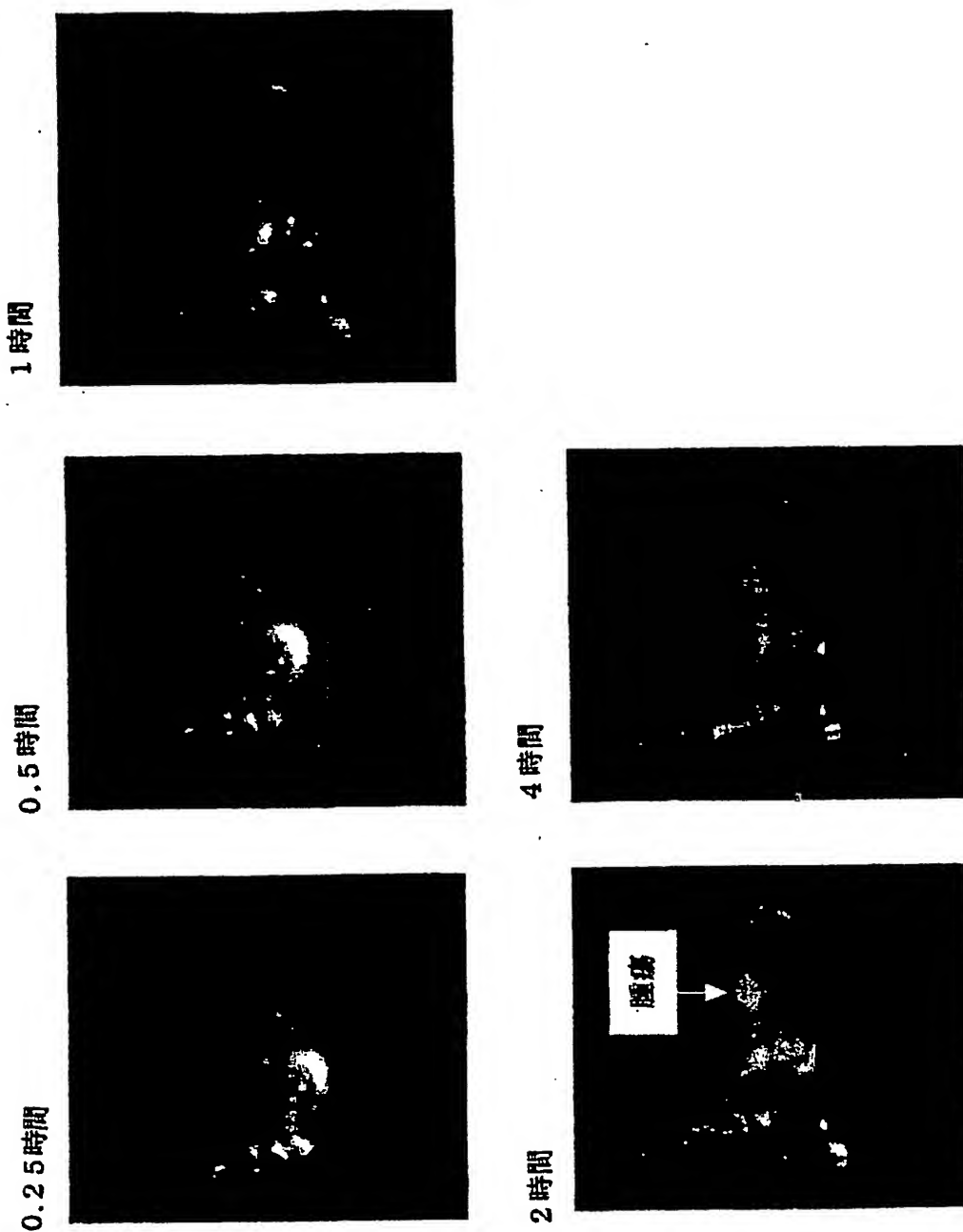
【書類名】

図面

【図1】

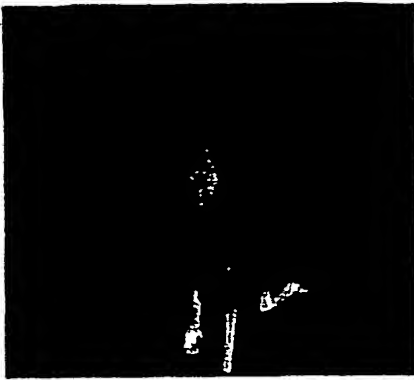


【図2】



【図3】

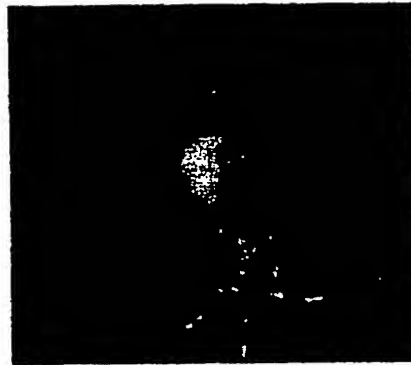
2時間



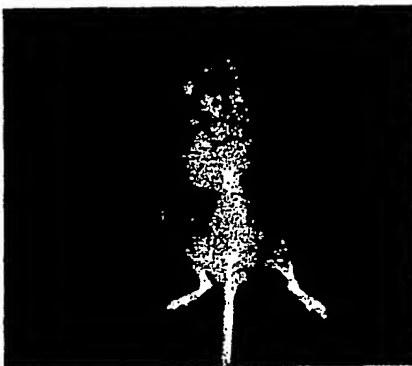
1時間



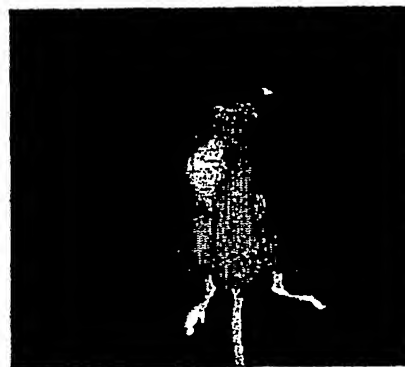
24時間



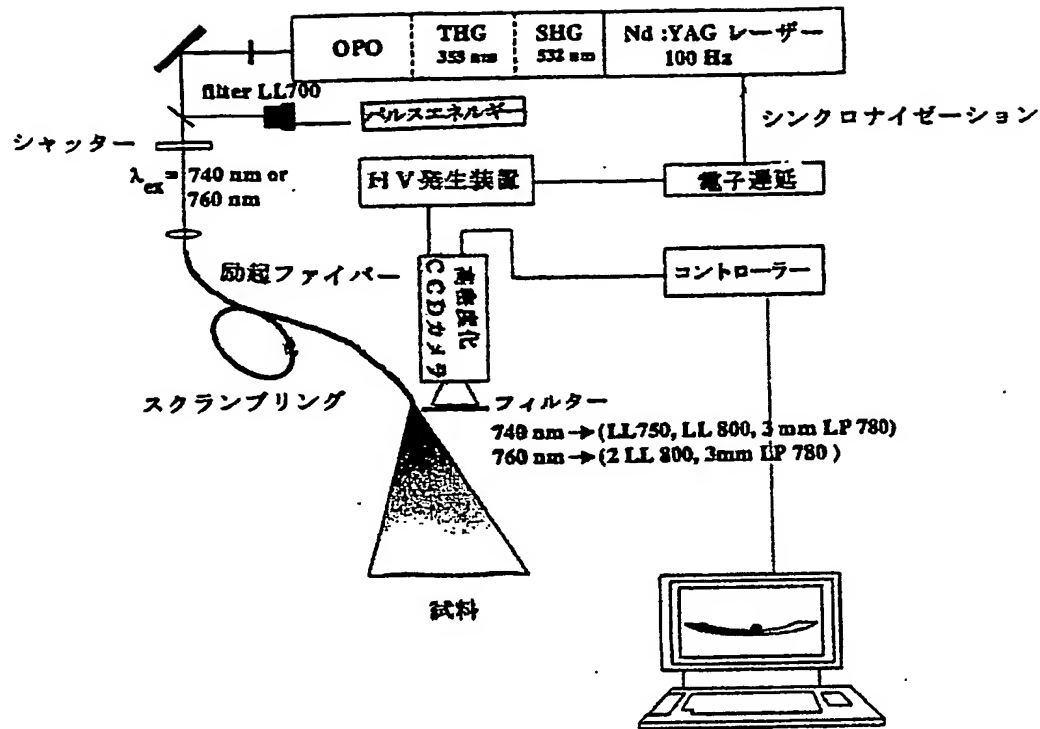
0.5時間



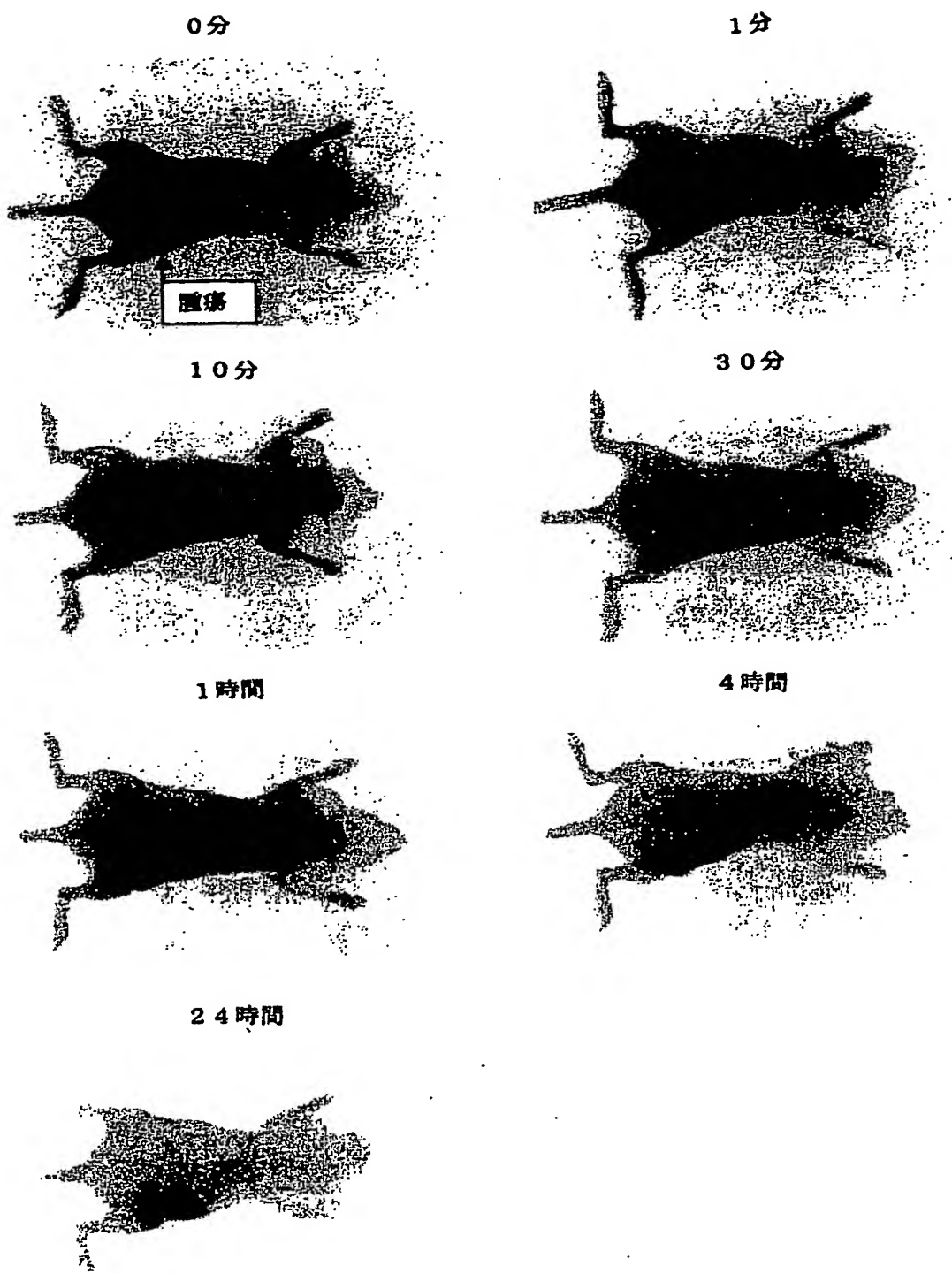
4時間



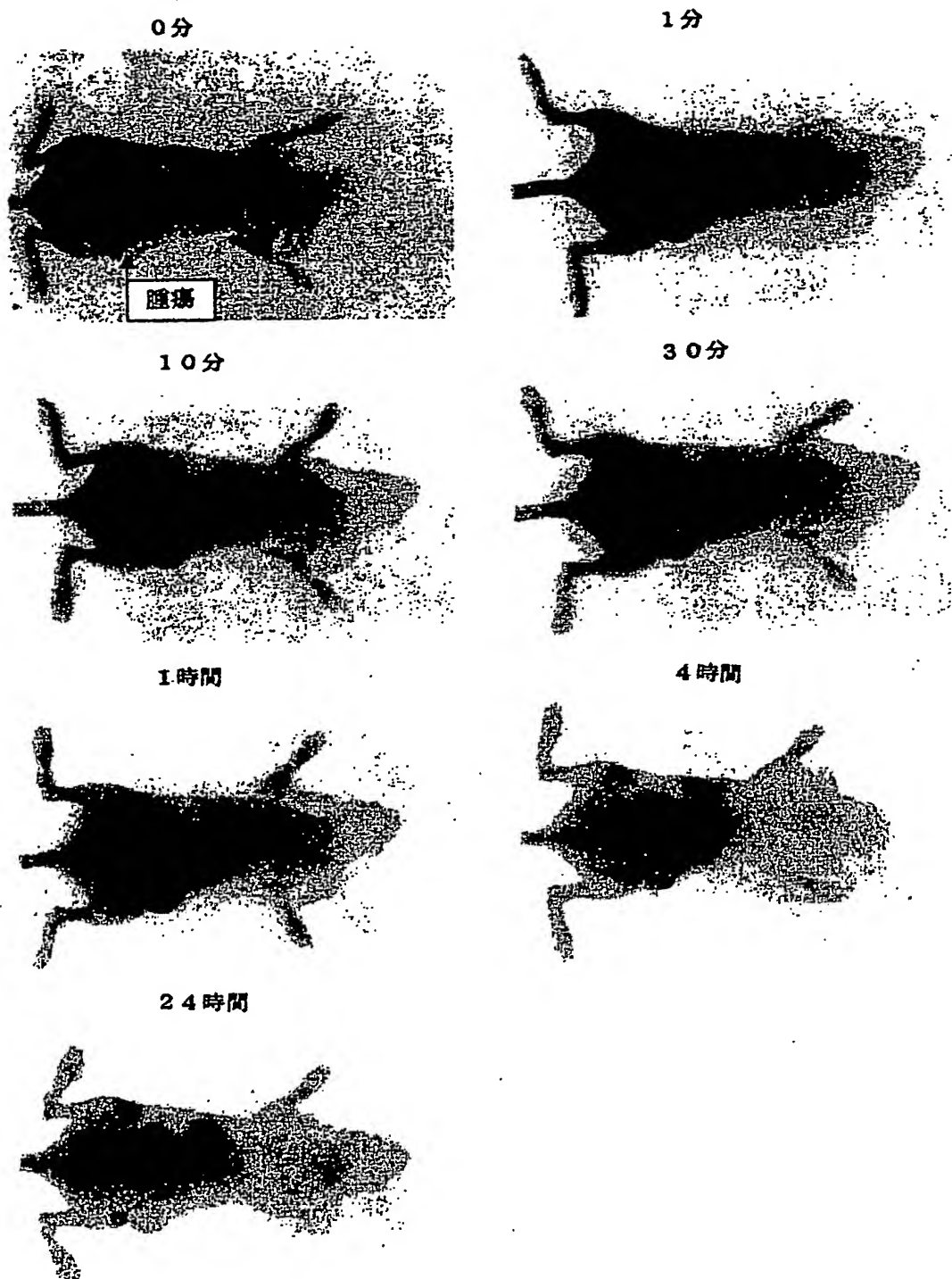
【図4】



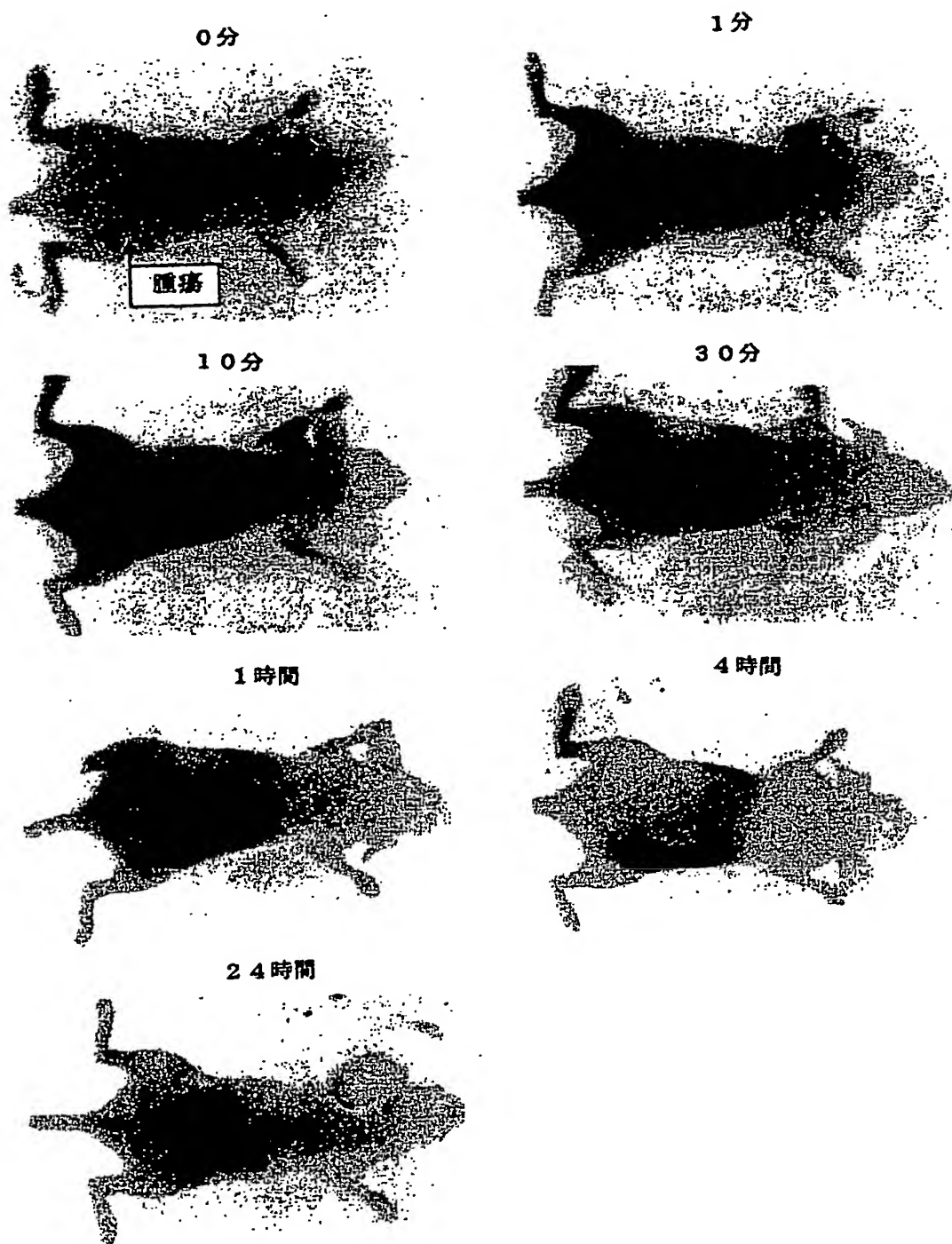
【図5】



【図6】



【図7】



【図8】

No.:8, マウス 17, 0 分, File 10SLi7



No.:8, マウス 17, 1 分, File 10SLi12



No.:8, マウス 17, 10 分, File 10SLi17



No.:8, マウス 17, 30 分, File 10SLi30



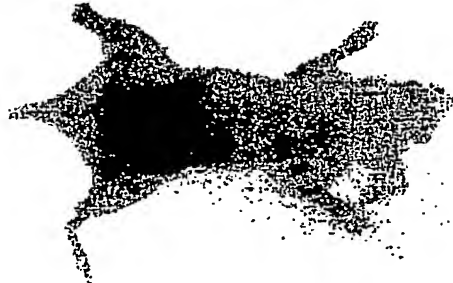
No.:8, マウス 17, 1 時間, File 10SLi43



No.:8, マウス 17, 4 時間, File 10SLi53



No.:8, マウス 17, 24 時間, File 11SLi2



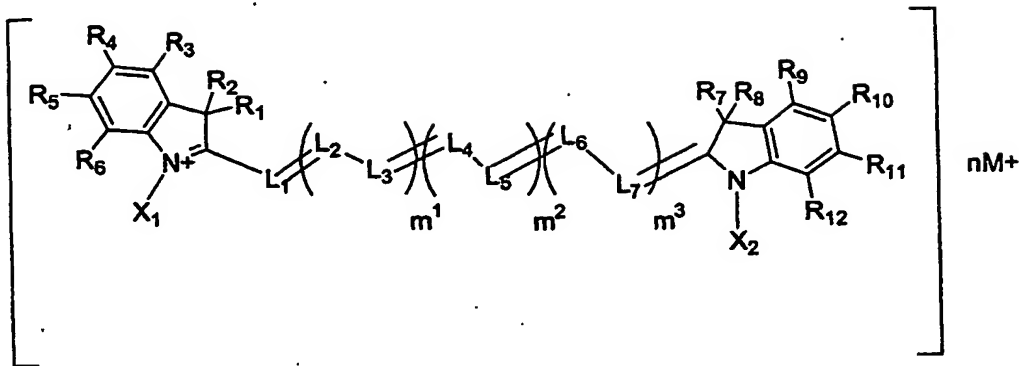


【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 下記の一般式（I）：

【化1】



（式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>7</sup>、及びR<sup>8</sup>は炭素数1～10のアルキル基などを示し；R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、R<sup>11</sup>、及びR<sup>12</sup>は水素原子、炭素数1～6のアルキル基、アリール基などを示し；X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は炭素数1～15のアルキル基またはアリール基を示し、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は全部で0から4個のカルボキシル基を有し；m<sup>1</sup>、m<sup>2</sup>、及びm<sup>3</sup>は0又は1を示し；L<sup>1</sup>～L<sup>7</sup>はそれぞれ独立してメチン基を示し；Mは水素原子、金属、又は第4級アンモニウム塩を示し；nは電荷を中和するために必要な1～7の整数を示す）

で表される化合物又はその医薬上許容される塩を含み、生体組織透過性に優れ、腫瘍及び／又は血管の特異的造影を可能にする近赤外蛍光造影剤。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-109794
受付番号	50200649491
書類名	翻訳文提出書
担当官	松野 邦昭 2209
作成日	平成14年 5月13日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000005201
【住所又は居所】	神奈川県南足柄市中沼210番地
【氏名又は名称】	富士写真フイルム株式会社

【特許出願人】

【識別番号】	300049958
【住所又は居所】	ドイツ連邦共和国 デー-13353 ベルリン ミューラーシュトラッセ 178
【氏名又は名称】	シエーリング アクチエンゲゼルシャフト

【代理人】

【識別番号】	100096219
【住所又は居所】	東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル 8階 特許業務法人特許事務所サイクス
【氏名又は名称】	今村 正純

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000005201]

1. 変更年月日

1990年 8月14日

[変更理由]

新規登録

住 所

神奈川県南足柄市中沼210番地

氏 名

富士写真フイルム株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [599131011]

1. 変更年月日 1999年 9月16日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 ドイツ連邦共和国, デー-13353 ベルリン, ミューラー  
シュトラッセ 178  
氏 名 シェリング アクチェンゲゼルシャフト
2. 変更年月日 2001年11月 7日  
[変更理由] 識別番号の統合による抹消  
[統合先識別番号] 300049958  
住 所 ドイツ連邦共和国, デー-13353 ベルリン, ミューラー  
シュトラッセ 178  
氏 名 シェリング アクチェンゲゼルシャフト

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [300049958]

1. 変更年月日 2001年11月 7日

[変更理由] 識別番号の二重登録による統合

[統合元識別番号] 599131011

住 所 ドイツ連邦共和国 デー-13353 ベルリン ミューラー  
シュトラッセ 178

氏 名 シエーリング アクチエンゲゼルシャフト